



**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN
PİGMENT ÜRETEN BAKTERİLERİN
TANILANMASI VE TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE
BOYAR MADDE OLARAK KULLANILMASI**

Merve ŞİMŞEK

Yüksek Lisans Tezi

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Derya EFE

2019

Her hakkı saklıdır.



**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN PİGMENT ÜRETEN
BAKTERİLERİN TANILANMASI VE TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE BOYAR
MADDE OLARAK KULLANILMASI**

Merve ŞİMŞEK

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Eş Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Derya EFE**

Anabilim Dalı: Moleküler Biyoloji ve Genetik

Erzurum

2019

Her hakkı saklıdır

T.C.
ERZURUM TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ ONAY FORMU

FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN PİGMENT ÜRETEN
BAKTERİLERİN TANILANMASI VE TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE BOYAR
MADDE OLARAK KULLANILMASI

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ danışmanlığında, Merve ŞİMŞEK tarafından hazırlanan bu çalışma 09 / 01 / 2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak **Oy birliği ile (5/0)** ile kabul edilmiştir.

Başkan	: Prof. Dr. Özlem BARIŞ	<i>İmza</i>	:
Üye	: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ	<i>İmza</i>	:
Üye	: Doç. Dr. Serkan ÖRTÜCÜ	<i>İmza</i>	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Derya EFE	<i>İmza</i>	:
Üye	: Dr. Öğr. Üyesi Ömer Faruk KARATAŞ	<i>İmza</i>	:

Yukarıdaki sonucu onaylıyorum

Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ
Enstitü Müdürü

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

Erzurum Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez içindeki tüm bilgilerin doğru ve tam olduğunu, bilgilerin üretilmesi aşamasında bilimsel etiğe uygun davrandığımı, yararlandığım bütün kaynakları atıf yaparak belirttiğimi beyan ederim.

09 / 01 / 2019

Merve ŞİMŞEK

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN PİGMENT ÜRETEN BAKTERİLERİN TANILANMASI VE TEKSTİL ENDÜSTRİSİNDE BOYAR MADDE OLARAK KULLANILMASI

Merve ŞİMŞEK

Erzurum Teknik Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ

Bu tez kapsamında önceki çalışmalarda izole edilen ve kültür koleksiyonunda bulunan izolatlardan pigment üretenler tespit edilerek klasik ve moleküler yöntemlerle tanılanmıştır. Bakterilerden metanol ekstraksiyon yöntemi kullanılarak izole edilen pigmentler TLC ve spektrofotometre kullanılarak karakterize edilmiştir. İzole edilen pigmentlerin tekstil endüstrisinde ipek kumaş üzerinde boyar madde olarak kullanımı değerlendirilmiştir. Ayrıca insan sağlığına etkileri; sağlıklı fibroblast hücre hattında MTT testi, eritrosit hücrelerinde ise hemolitik aktivite testi ile belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda ortalama 570 izolattan en iyi pigment oluşturduğu gözlenen 6 izolat belirlenmiş ve bunlardan AS-54, AS-55, AS-67 izolatları *Serratia plymuthica* AS-75 izolatı *Serratia marcescens*, AHS izolatı *Micrococcus luteus*, FAS-TUR izolatı ise *Paracoccus marcusii* olarak tanılanmıştır. Tanılanan izolatlardan elde edilen pigmentlerin karakterizasyonu sonucunda, AHS ve FAS-TUR izolatlarından elde edilen pigmentlerin literatür verileriyle karşılaştırıldığında beta-karoten, diğer izolatlardan elde edilen pigmentlerin de prodigiosin olduğu belirlenmiştir. Pigmentlerin ipek kumaş boyamada olumlu sonuç verdiği, hücre canlılığı üzerine olan etkilerine bakıldığında ise; hemolitik aktivite göstermediği ve toksik etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir. Bu bağlamda izole edilen pigmentlerin tekstil endüstrisinde çevre-dostu doğal kumaş boyası olarak kullanımının mümkün olabileceği sonucuna varılmıştır.

2019, 63 sayfa

Anahtar Kelimeler: *S. marcescens*, *S.plymuthica*, *P. Marcusi*, *M. luteus*, pigment, bakteri, tekstil, toksisite

ABSTRACT

MS. Thesis

IDENTIFICATION OF PIGMENT PRODUCING BACTERIA ISOLATED FROM DIFFERENT SOURCES AND USE AS DYESTUFF IN TEXTILE INDUSTRY

Merve ŞİMŞEK

Erzurum Technical University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Arzu GÖRMEZ

In this study, the isolates that were isolated in the previous studies in culture collection were evaluated in term of pigment production. The isolates producing pigments were identified by classical and molecular methods. The pigments were isolated from bacteria by using methanol extraction method and characterized by TLC and spectrophotometer. The pigments were evaluated as dyestuff on silk fabric in textile industry. Besides their effects on human health were searched by MTT test on healthy fibroblast cell line and hemolytic activity test on erythrocyte cells. As a result of the study, 6 isolates were determined to produce the best pigment from 570 isolates. The isolates coded as AS-54, AS-55, AS-67 were identified as *Serratia plymuthica*, the isolate coded as AS-75 was identified as *Serratia marcescens*, the isoate coded as AHS was identified as *Micrococcus luteus*, the isolate coded as FAS-TUR was identified as *Paracoccus marcusii*. As a result of the characterization of the pigments, the pigments were found to be beta-carotene and prodigiosin for the isolates coded as AHS, FAS-TUR isolates and the others, respectively. At the end of the process of silk fabric dyeing, the colour of the fabrics were determined as different shades of pink, orange and yellow. The pigments did not exhibit any hemolytic activity and toxic effect on fibroblast cell line.

2019, 63 page

Keywords: *S. marcescens*, *S. plymuthica*, *P. Marcusii*, *M. luteus* pigment, bacteria, textile, toxicity

TEŞEKKÜR

İlk olarak bu tezin gerçekleştirilmesinde bilgi birikimlerinden faydalandığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum, değerli danışman Hocam Doç. Dr. Arzu GÖRMEZ'e gösterdiği hoşgörü ve sabrından dolayı teşekkür ederim.

Tezim süresince fikirlerini, yardımlarını ve desteğini esirgemeyen değerli eş danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Derya EFE'ye teşekkür ederim.

Tezim süresince yardımlarını eksik etmeyen değerli Hocam Araştırma Görevlisi Fatma Necmiye KACI'ya sabrından ve bana kattıklarından dolayı teşekkür ederim.

Bitki Biyoteknolojisi, Mikrobiyoloji ve Hücre Kültürü Laboratuvarları'ndaki tüm çalışma arkadaşlarıma yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni büyük fedakarlıklar ile bugüne getiren, maddi manevi desteklerini benden hiçbir zaman esirgemeyen başta biricik annem, canım babam, varlıklarını her zaman hissettiğim canım ablalarım ve canım abime teşekkür ederim.

Daima yanımda olduğunu hissettiren bana hep destek olan Selim GEYİK'e teşekkür ederim.

Son olarak da beni yetiştiren Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümündeki tüm hocalarım ile çalışmamı gerçekleştirdiğim Erzurum Teknik Üniversitesi Yüksek Teknoloji ve Araştırma Merkezi'ne (ETÜ-YÜTAM) teşekkür ederim.

Merve ŞİMŞEK
Ocak 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Pigment Kullanımının Tarihsel Gelişimi.....	1
1.2. Sentetik Boyalar.....	2
1.3. Doğal Boyalar.....	3
1.3.1. Klorofiller.....	4
1.3.2. Karotenoidler.....	5
1.3.3. Flavonoidler.....	5
1.3.4. Betalainler.....	6
1.3.5. Kurkumin.....	7
1.3.6. Melaninler.....	7
1.3.7. Prodigiosin.....	8
1.3.8. İndigo.....	8
1.3.9. Fenazin.....	9
1.3.10. Violacein.....	9
1.4. Bakteriyel Pigment Üretimi.....	10
1.4.1. <i>Micrococcus</i> Türleri.....	11
1.4.1.1. <i>Micrococcus luteus</i>	12
1.4.2. <i>Paracoccus</i> Türleri.....	12
1.4.2.1. <i>Paracoccus marcusii</i>	12
1.4.3. <i>Serratia</i> Türleri.....	12
1.4.3.1. <i>Serratia marcescens</i>	13
1.4.3.2. <i>Serratia plymuthica</i>	13
1.4.2. Doğal Boyaların Kullanım Alanları.....	13
1.4.3. Doğal Boyaların Kullanımını Sınırlayan Faktörler.....	15
2. KAYNAK ÖZETLERİ	17
3. MATERYAL ve YÖNTEM	23
3.1. Materyal.....	23

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler.....	24
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. Pigment Üreten Bakterilerin Seçimi	26
3.2.2. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	27
3.2.2.1. Hücre Morfolojisi Testi.....	27
3.2.2.1. Gram Boyama	27
3.2.2.3. Hareketlilik Testi.....	27
3.2.3. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	28
3.2.3.1. Katalaz Testi.....	28
3.2.3.2. Oksidaz Testi.....	28
3.2.4. Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanılanması	28
3.2.4.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu	28
3.2.4.2. Bakterilerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması.....	29
3.2.4.3. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi	29
3.2.4.4. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Klonlanması	30
3.2.4.5. 16S rRNA Gen Bölgeleri Sekans Analizi	32
3.3. Bakterilerden Pigment İzolasyonu	32
3.3.1. Pigmentlerin Karakterizasyonu	32
3.3.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	32
3.3.1.2. Spektrofotometrik Ölçümler	33
3.3.2. Pigmentlerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi	33
3.3.2.1. Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti.....	33
3.3.2.2 Hemoliz Aktivitesinin Tespiti	34
3.3.2.3. Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Tespiti	34
3.3.3. İzole Edilen Pigmentlerin Kumaş Boyası Olarak Uygulanması	35
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	36
4.1. Pigment Üreten Bakterilerin Seçimi	36
4.2. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi	36
4.3. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	37
4.4. Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanılanması	39
4.4.1. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu.....	39
4.4.2. Bakterilerin 16S Rrna Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması ve Jel Elektroforezi.....	39
4.4.3. 16S PCR Ürünlerinin Kompotent <i>E. coli</i> Hücrelerine Klonlanması.....	39
4.4.4. 16S rRNA Gen Bölgeleri Sekans Analizi Sonuçları.....	40
4.5. Pigment İzolasyonu	42
4.5.1. Pigmentlerin Karakterizasyonu	44

4.5.2. Pigmentlerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi	48
4.5.2.1. Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti.....	48
4.5.2.2. Hemoliz Aktivitesinin Tespiti	49
4.5.2.3. Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Tespiti	50
4.6. İzole Edilen Pigmentlerin Kumaş Boyası Olarak Uygulanması	51
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	53
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ.....	63



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler Açıklama

%	Yüzde
bp	Baz çifti
cm	Santimetre
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
nm	Nanometre
°	Derece
sn	Saniye
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

Kısaltmalar

C	Santigrat
DNA	Deoxiribonükleik asit
LBA	Luria-Bertani Agar
NA	Nutrient Agar
NB	Nutrient Broth
OD	Optik Dansite
PCR	Polimerase Chain Reaction & Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Reoxiribonükleik asit
TLC	Thin Layer Chromatography & İnce Tabaka Kromatografisi
TSA	Tryptic Soy Agar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Sentetik boyaların gösterdiği yapısal çeşitlilik	3
Şekil 1.2 Klorofil a ve Klorofil b yapısı.....	4
Şekil 1.3 Karotenoidlerin yapısı.....	5
Şekil 1.4 Flavonoid çeşitlerinin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.5 Betalain yapısı.....	6
Şekil 1.6 Kurkumin yapısı	7
Şekil 1.7 Melanin yapısı.....	7
Şekil 1.8 Prodigiosin yapısı.....	8
Şekil 1.9 İndigo yapısı	8
Şekil 1.10 Piyosiyenin yapısı	9
Şekil 1.11 Violaceinin yapısı	10
Şekil 4.1 İzole edilen bakterilerin besi ortamındaki görüntüleri.....	36
Şekil 4.2 Bakteriyel izolatların filogenetik ağacı	40
Şekil 4.3 Evaporatör ile metanolun pigmentten uzaklaştırılması.....	43
Şekil 4.4 Kurutulmuş pigmentler	43
Şekil 4.5 AHS pigmentinin 400-410 nm’de maksimum verdiği ışımaya.....	45
Şekil 4.6 FAS-TUR pigmentinin 450-460 nm’de verdiği maksimum ışımaya	46
Şekil 4.7 AS-54 pigmentinin 536 nm’de verdiği maksimum ışımaya.....	46
Şekil 4.8 AS-55 pigmentinin 537 nm’de verdiği maksimum ışımaya.....	47
Şekil 4.9 AS-67 pigmentinin 537 nm’de verdiği maksimum ışımaya.....	47
Şekil 4.10 AS-75 pigmentinin 537 nm’de verdiği maksimum ışımaya.....	48
Şekil 4.11 İzole edilen pigmentlerin hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi.....	49
Şekil 4.12 İzole edilen pigmentlerin PBS içerisinde çözünmesi	50
Şekil 4.13 İzole edilen pigmentlerin sitotoksik aktivitesi	51
Şekil 4.14 İpek kumaş boyama sonuçları.....	52

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 Pigment üreten bakteriler.....	11
Çizelge 3.1 Sarf malzemeler	23
Çizelge 4.1 İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri	38
Çizelge 4.2 Bakteriyel izolatların tanı sonuçları	41
Çizelge 4.3 İzole edilen pigment miktarları.....	44



1. GİRİŞ

1.1. Pigment Kullanımının Tarihsel Gelişimi

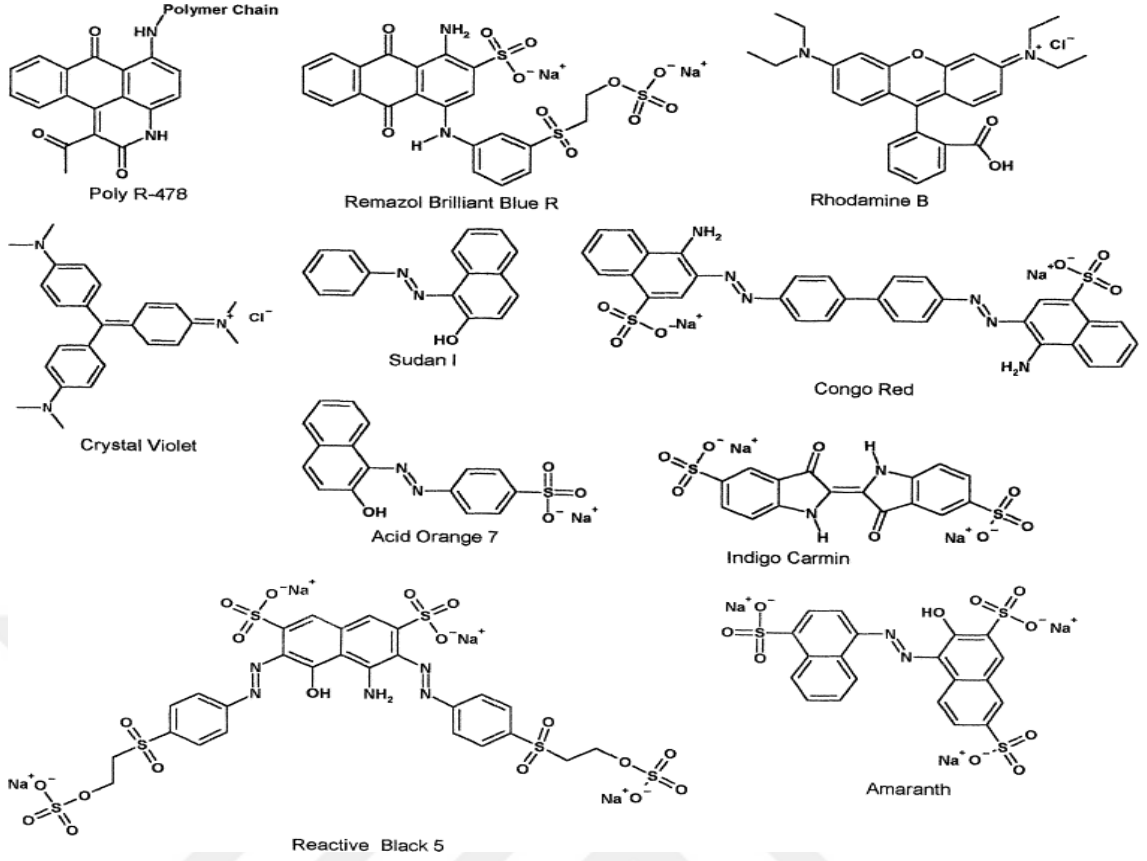
Pigmentler, görünür dalga boylarında ışığı absorbe eden kimyasal bileşenlerdir. Kaynaklarına göre organik ve inorganik olarak sınıflandırılan pigmentlerden organik olanlar doğal veya sentetik olarak incelenmektedir. Doğal pigmentler bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar tarafından üretilirken, sentetik pigmentler yapay olarak üretilmektedir. İnorganik pigmentler ise doğada bulunabildiği gibi sentez yoluyla da üretilmektedir (Erdal ve Ökmen 2013). Pigmentlerin renk verme özelliği eski çağlardan beri fark edilmiş olup her dönem insan hayatının bir parçası olmuştur. İnsanlar bazen yaşadıkları çevreye bir iz bırakmak, bazen kıyafetlerini renklendirmek, bazen kendilerini güzelleştirmek için renk veren bu maddelere ihtiyaç duymuştur. Çevrelerinde bulunan renkli bitkilere, madenlere olan ilgileri bunları boyar madde olarak kullanıma itmiş ve böylelikle doğal boyalar hayatımıza girmeye başlamıştır. Yazılı kayıtlara göre boyar maddeler, ilk olarak M.Ö. 2600 yıllarında Çin'de kullanılmıştır (Siva 2007). İlk boyama işlemlerinde genellikle ilkel boyama teknikleri kullanılarak, bitkiler ya ham halde ya da kaynatılıp özütü alınarak kumaşlara uygulanmıştır. Ancak yeni tekniklerin ve medeniyetlerin gelişmesiyle farklı yöntemler kullanılmaya başlanmış ve daha geniş yelpazede uygulama alanları ortaya çıkmıştır. Örneğin Aztek ve Maya Uygarlıkları döneminde tekstil için kullanılan koşineal boyası günümüzde gıda sektöründe de kullanılmaya başlanmıştır. Çivit otu, kına, safran tarih boyunca kullanılan ve günümüze kadar ulaşmış doğal boya kaynaklarından sadece birkaçı olmuştur (Gulrajani 1992). Ancak doğal boyaların üretimindeki sorunlar nedeniyle piyasadaki talep yeterince karşılanamadığından sentetik boyaların ortaya çıkması kaçınılmaz olmuştur. İlk olarak 1856'da Pekin'de sentetik boyaların tanıtılmasıyla birlikte ucuz olan bu boyaların kullanımı artmış ve doğal boyalara olan talep giderek azalmıştır. Bunun yanında yarı sentetik boyalar üretilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Ancak tarih boyunca elde edilmesi zor olan doğal pigmentlerin üretimi organik kimyadaki gelişmelere paralel olarak 20. yy'den itibaren kolaylaşmış ve doğal boyalar yeniden dikkat çekmeye başlamıştır (Venil *et al.* 2013).

1.2. Sentetik Boyalar

İlk olarak 1856'da keşfedilen sentetik boyalar çok hızlı bir gelişim göstererek kısa sürede çeşitlenmiştir. Sentetik boyaların zamanla kimyasal sınıfları farklılaşmış ve endüstriyel ölçekte azo, antrakinon, kükürt, indigoid, trifenilmetil (tritol) ve ftalosiyanın grupları en çok kullanılan türevleri olmuştur.

Sentetik boyalar tekstil, deri, kâğıt, gıda, kozmetik gibi pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kullanım alanlarının geniş olması nedeniyle 100.000 çeşidin üzerinde sentetik boya üretilmiş olup dünya genelinde yıllık 7×10^5 bin ton üretime sahip olduğu bilinmektedir (Forgacs *et al.* 2004). Geleneksel tekstil endüstrisinde, yaklaşık 1 kg tekstil malzemesini boyamak için yaklaşık 100 L su tüketilmekte ve bu nedenle özellikle tekstil boyama işlemi sırasında, boya sınıfına bağlı olarak, atık su kayıpları, %'50'lere ulaşabilmektedir. Atık su üretilmesinin yanında boyama sularının ve boya atıklarının genellikle çevredeki yüzey ve yeraltı sularına karışması sonucunda da ciddi kirlilik problemleri oluşmaktadır. Yine sulara karışan atık boyalar güneş ışığının su içerisine geçişine engel olmakta ve böylelikle su içerisinde yaşayan pek çok organizmanın fotosentezini ve gelişimini de engellemektedir (Sudova *et al.* 2007). Ortalama bir yılda 280.000 ton tekstil boyasının kullanıldığı düşünülürse durumun ne kadar önem arz ettiği açıktır. Son yıllarda, benzidin ve diğer aromatik bileşikler gibi bilinen kanserojen maddelerden oluşan boyaların kullanımı ve bunların toksisite ve kanserojen etkilerinden dolayı sentetik boyalara temkinli yaklaşılmaktadır. Kısaca sentetik boyaların kullanımı arttıkça çevreye ve canlılara verdiği zararlar da artmaktadır. Özellikle bazı toksik etkili kimyasal tekstil boyaları ile boyanan giysilerin ciltle uzun süre teması sonucunda; kişinin vücut ısısının artmasıyla beraber terlemeye izin vermek için açılan cilt gözeneklerinden emildiği ve bu durumunda insan sağlığını ciddi anlamda tehlikeye soktuğu hatta kanser oluşumuna neden olduğu bilinmektedir. Sentetik boyaların bir kısmı yetişkinlerde kimyasal duyarlılık belirtilerinden olan cilt döküntüleri, baş ağrıları, bulantı, ishal, yorgunluk, kas ve eklem ağrısı, baş dönmesi, solunum zorluğu, düzensiz kalp atışına neden olabilmekte, çocuklarda ise yüzde ve kulaklarda kızarmalar, gözaltında koyu halkalar, hiperaktivite, davranış veya öğrenme sorunları gibi belirtiler oluşturabilmektedir (Chavan 2013).

1. GİRİŞ



Şekil 1.1 Sentetik boyaların gösterdiği yapısal çeşitlilik (Forgacs *et al.* 2004).

1.3. Doğal Boyalar

Sentetik boyaların insan sağlığı ve çevreye olumsuz etkileri sonucunda araştırmacılar çalışmalarını doğal boyalar üzerinde yoğunlaştırmıştır. Doğal boyaların bir kısmı minerallerin yapısında bulunsa da büyük bir kısmı canlı organizmalar içerisinde yer almaktadır. Doğal boyaların en çok tercih edildiği organizmalar; bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalardır. Doğal boyalar bu organizmaların doğal yapısında serbest halde bulunabildikleri gibi, şeker (glikozit halinde) veya proteinlerle birleşmiş olarak da bulunabilirler (Çakmakçı 1994). Coccoidea ve Aphidoidea familyalarına ait birçok böcek cinsi ve türü doğal boya kullanımında tercih edilmektedir. Doğal boyaların tercih edildiği ilk canlılar bitkilerdir (Rubia kök boya bitkisi, annatto, aspir, bataklık kızılıcı, gardenya, havacıva (alkannin), kırmızıbiber, kırmızı pancar, monaskus, hubiskus, üzüm, zerdeçal, sandalodunu, turunçgiller, sarı mısır, kadife çiçeği, sumak, mürver, kızılıcık, soğan, şekerçi boyası, boya kökü, kırmızılaha kadife çiçeği, haşhaş, gülhatmi ve gündüz sefası gibi çiçekler (Özcan ve Akgül 1995). Bilinen pek çok bitkisel boya hala tercih edilse de üretilmelerinin zor ve zaman alması, üretilmiş oldukları pigmentlerin

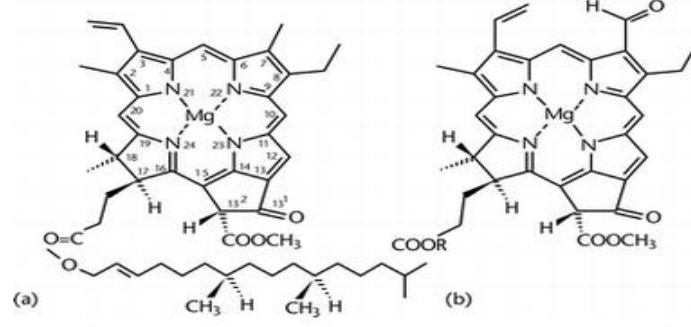
1. GİRİŞ

izolasyonunda yaşanan sıkıntılar ve özellikle endemik türlerde türün ortadan kalkması gibi problemleri nedeniyle son zamanlarda onlara alternatif doğal boya arayışları gündeme gelmiştir. Mikroorganizmalar, kolay üretilmeleri ve manipülasyonlarının kolay olması nedeniyle bitkilere alternatif olarak tercih edilen organizmalardır. Yapılan bazı çalışmalarda mikroorganizmalardan doğal boyalar elde edilmiş ve uygun pH, ısı, ışık ve saklama koşulları göz önünde bulundurularak doğal renkler üretilmiştir (Samyuktha and Mahajan 2016). *Monascus* sp. (küf), orçil (liken), algler ve bakteriler bu bağlamda en sık kullanılan doğal boya kaynaklarıdır. Doğal boyaların renk verme özelliklerinin yanında antioksidan, antimikrobiyal ve antimutajenik aktivitelerinin olduğu da bildirilmiş ve bu nedenle eski zamanlarda olduğu gibi sentetik ve yarı sentetik boyalar yerine doğal boyalara olan ilgi artmıştır (Erdal ve Ökmen 2013).

Doğal olarak bulunan başlıca pigmentler antosiyaninler (flavonoidler), karotenoidler ve klorofiller olarak üç grup altında incelenmiştir. Bunlara ek olarak bakterial pigmentler ele alınmıştır.

1.3.1. Klorofiller

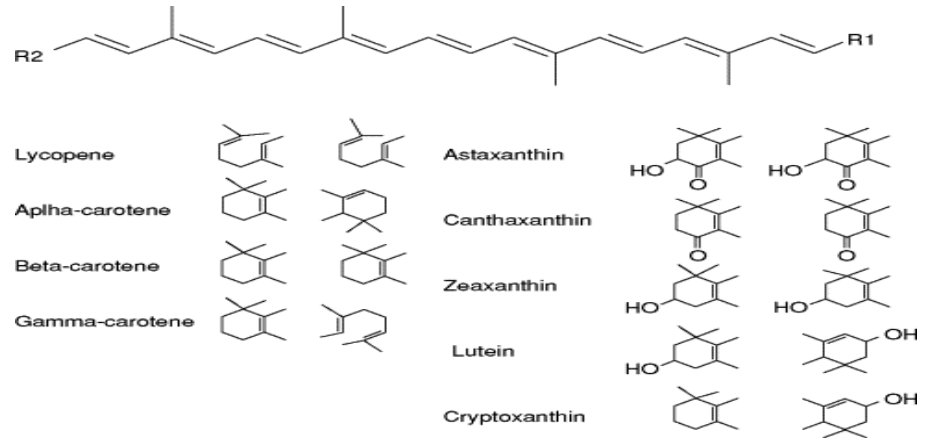
Klorofil birçok bakteri, alg ve bitkide fotosentez işlemi sonucu oluşan yeşil pigmentli yapıdır. Fotosentez yapan yaşam formlarından kolaylıkla ekstrakte edilebilen klorofil pigmentleri, doğada en bol bulunan doğal pigmentlerdir. Klorofil pigmentinin insan sağlığı için pek çok yararı olduğu bilinmektedir. Klorofilin kanser riskini azalttığı ve bazı kimyasal karsinogen, mutajen ve serbest radikaller için güçlü bir antioksidan özellik gösterdiği bildirilmiştir (Chen and Roca 2018).



Şekil 1.2 Klorofil a ve Klorofil b yapısı (Grimm 2006)

1.3.2. Karotenoidler

Karotenoidler, C40 izopren iskeletinden oluşan, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından üretilen, kırmızı, turuncu ve sarı renkli pigmentlerdir (Abdalla 2003). Karotenoidlerin kronik hastalıkların önlenmesinde önemli bir rol oynadığı ve antikanserojen özellik gösterdiği bilinmektedir. Günümüze kadar yaklaşık 600'den fazla farklı karotenoid tanımlanmış olup bunlardan en iyi bilinenler alfa-karoten, beta-karoten ve kriptoksindir (Astley 2003).



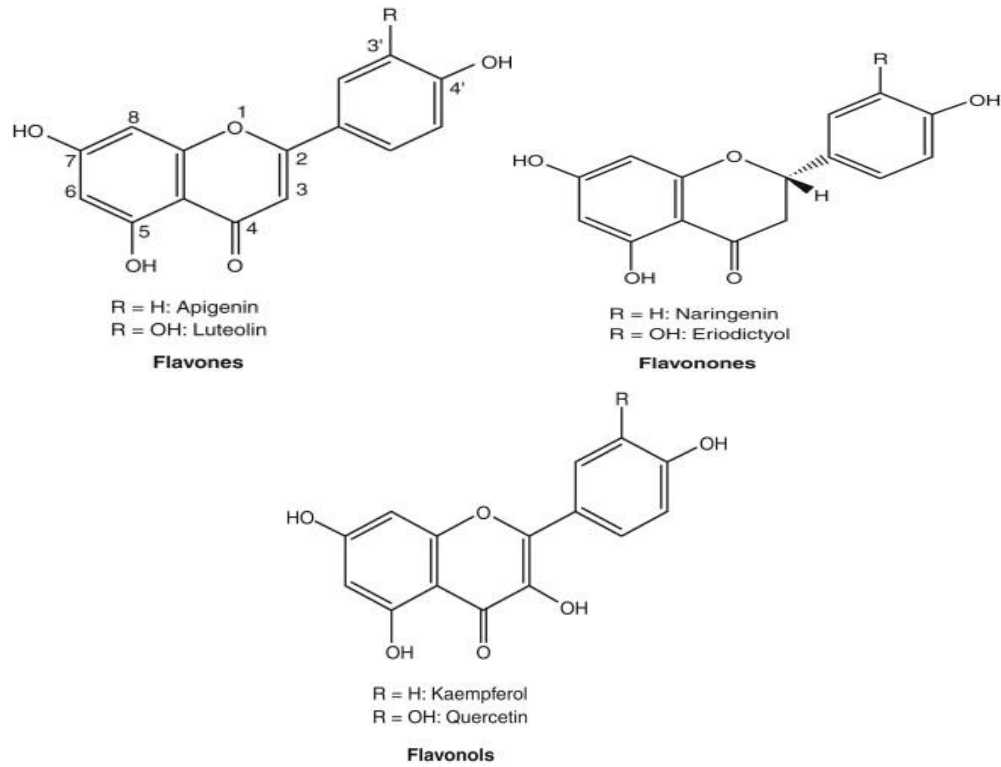
Şekil 1.3 Karotenoidlerin yapısı (Astley 2003)

1.3.3. Flavonoidler

Flavonoid pigmentler sarı, beyaz, mavi veya mor renkli suda çözünen ikincil bir fenilpropanoid sınıfı bitki metabolitleridir (Forkmann 1991). Yapısal olarak, bir benzo-gamma-pironu birleştiren tek bir benzen halkasından oluşan flavonoidler, üç asetat

1. GİRİŞ

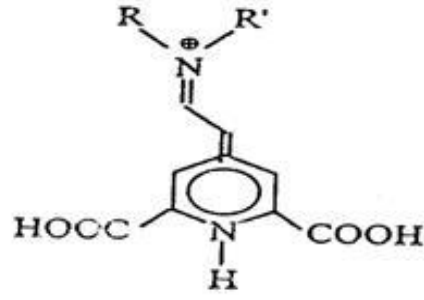
ünitesinden ve bir fenilpropan biriminden (shikimik asit yolu ile) oluşurlar. Flavonoidlerin sayısı 2000'den fazladır, bunların yaklaşık 500 kadarı serbest durumda ve geri kalanı ise suda çözünen gruplar olan O-glikozit veya C-glikozit halindedir. Karbon 3'teki oksijenasyon durumuna göre sınıflandırılan üç ana tipi vardır. Bunlar flavonlar, flavonoller ve flavononlardır (Mills 2013). Birçoğu çiçeklerin, meyvelerin ve yaprakların renklerinden sorumlu 8000'den fazla flavonoid yapıları tanımlanmıştır. Flavonoidlerin aynı zamanda bitki yapraklarını ultraviyole ışınlarından koruduğu da düşünülmektedir (Babu and Liu 2009).



Şekil 1.4 Flavonoid çeşitlerinin kimyasal yapısı (Mills 2013).

1.3.4. Betalainler

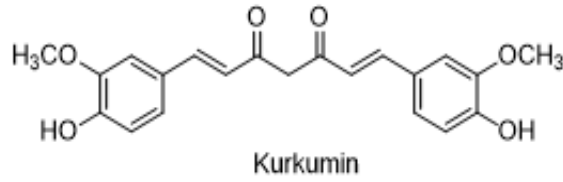
Betalainler kırmızı renge sahiptir. Betasiyaninler (kırmızı-mor) ve betaksantinler (sarı) olarak iki gruba ayrılır. Günümüze kadar tanımlanmış 50'den fazla türü olan betalainler, suda çözünebilir, ısı, ışık ve oksijen ile hızla parçalanır, genellikle orta asitlik pH değerlerinde stabil bir yapıya sahiptir. Betalainler doğada kısıtlı dağılıma sahip olmasına rağmen, özellikle kırmızı olanlar pazı ve pancar gibi bitkilerden üretilmektedir (Lea 2003).



Şekil 1.5 Betalain yapısı (Stintzing 2004)

1.3.5. Kurkumin

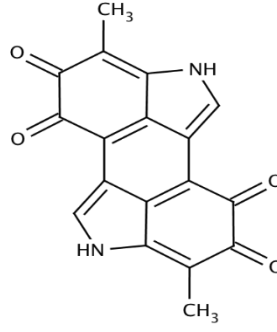
Kurkumin sarı renge sahip, köri baharatının ana maddesi olarak bilinen bir polifenoldür (Darwin 1959). Kurkuminin antimikrobiyal (özellikle bakteri ve viral enfeksiyonlarına karşı) ve antikanser özelliklerinin olduğu bilinmektedir. Antikanser özelliklerinin araştırıldığı çalışmada *in-vitro* malign hücrelerin apoptozisine neden olduğu ancak sağlıklı hücreleri etkilemediği tespit edilmiştir (Christinet *et al.* 2004).



Şekil 1.6 Kurkumin yapısı (Farazuddin *et al.* 2014)

1.3.6. Melaninler

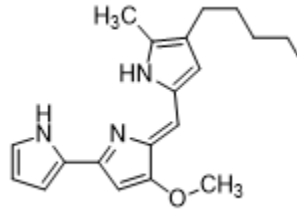
Melaninler, insanlarda ve hayvanlarda bulunan, derideki hücreler ve melanosit adı verilen saç kökleri tarafından sentezlenen bir grup doğal pigmentlerdir. Melaninlerin aynı zamanda deriyi UV ışınlarından koruduğu bilinmektedir. Melanin, melanosomlar olarak adlandırılan melanositler içindeki sitoplazmik organellerde depolanır (Rosenberg 2012). Eumelanin (kahverengi-siyah pigment üretenler) ve feomelanin (turuncudan kırmızıya pigment üretenler) olarak bilinen iki temel melanin sınıfı bilinmektedir.



Şekil 1.7 Melanin yapısı

1.3.7. Prodigiosin

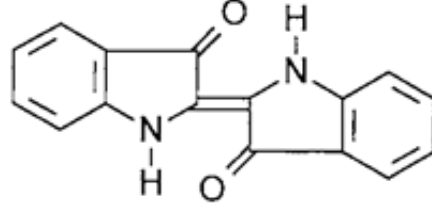
Prodigiosin, kırmızı renkli alkaloid ailesinden 4-metoksi- α - α -bipirolo yapısına sahip doğal bir pigmenttir. Prodigiosin bu ailenin asiklik üyelerini, metasikloprodigiosin ve nonilprodigiosin ise siklik üyelerini temsil etmektedir. *Serratia* türleri, *Pseudomonas magnesorubra*, *Vibrio psychroerythrous*, *Vibrio gazogenes*, *Alteromonas rubra*, *Rugamonas rubra*, *Streptovorticillium rubroreticuli* ve *Streptomyces longisporus ruber* tarafından üretilmektedir (Khanafari *et al.* 2006).



Şekil 1.8 Prodigiosin yapısı (Srimathi 2017)

1.3.8. İndigo

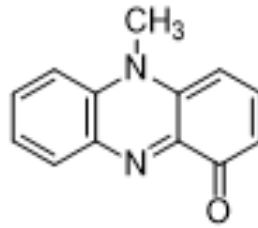
İndigo, Hindistan’ da yetişen indigo (*Indigofera tinctoria* L.) bitkisinden elde edilen mavi renkli pigmenttir (Dölen 1992). Pigmentin yapısı iki indoksil molekülünün birleşmesinden türetilmiş olan bir aromatik bileşiktir. İndigo tekstil boyamacılığında kullanılmasının yanı sıra antik çağlardan beri kozmetik, kanama durdurucu, iltihaplanmayı, kanseri ve ülseri önleyici olarak da kullanılmıştır (Kumar and Sinha 2004).



Şekil 1.9 İndigo yapısı (Saikhao *et al.* 2018)

1.3.9. Fenazin

Fenazinler, sarı-mor ya da sarı-kırmızı renkli, içerdikleri fonksiyonel grupların tipine ve konumuna bağlı olarak farklılık gösteren N-heterosiklik bileşiklerdir. Doğada 100'den fazla farklı fenazin yapısal türevi tanımlanmış ve fenazin içeren 6.000'den fazla bileşik sentezlenmiştir (Mavrodi, Blankenfeldt *et al.* 2006). Bilinen tek doğal fenaz kaynağı olan bakteriler içerisinde en önemlisi *Pseudomonas aeruginosa* tarafından üretilen piyosiyenin (5-N-metil-1-hidroksifenazin) olmuştur. *P. aeruginosa*'dan başka üreticileri arasında, *Nocardia*, *Sorangium*, *Brevibacterium*, *Burkholderia*, *Erwinia*, *Pantoea agglomerans*, *Vibrio* ve *Pelagibacter* cinsleri de bilinmektedir (Mavrodi *et al.* 2006, Mentel *et al.* 2009, Mavrodi *et al.* 2010). Ayrıca arkelerde de fenaz türevleri olduğu belirtilmiştir.



Şekil 1.10 Piyosiyenin yapısı

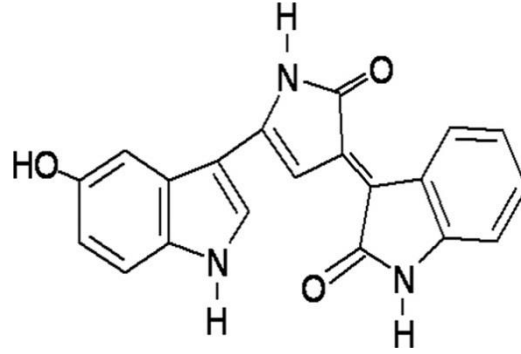
1.3.10. Violacein

Violacein [3- (1,2-dihidro-5- (5-hidroksi-1 H-indol-3-il) -2-okso-3H-pirol-3-ilden)-1,3-dihidro-2H-indol-2-one] koyu mor tonlu indol türevi bir bileşik olup

1. GİRİŞ

Janthinobacterium lividum, *Pseudoalteromonas luteoviolacea*, *Alteromonas luteoviolacea* ve *Chromobacterium violaceum* gibi çeşitli bakteriler tarafından üretilmektedir (Laatsch *et al.* 1984, Yada *et al.* 2008, Rodrigues *et al.* 2012, Rahul, *et al.* 2015). Son zamanlarda, *J. lividum* izolatının taslak genom dizisi yayınlanmış ve bu bakterinin aynı zamanda violacein üretiminin biyosentezi ve düzenlenmesini yaptığı ortaya koyulmuştur (Wu *et al.* 2017).

Violacein'in antimikrobiyal, antiviral ve antitümör özelliklere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Leon *et al.* 2001, Nakamura *et al.* 2003, Kodach *et al.* 2005, Masuelli, *et al.* 2016).



Şekil 1.11 Violacein yapısı

1.4. Bakteriyel Pigment Üretimi

Mikrobiyal pigment kaynağı olarak en çok tercih edilen mikroorganizmalar fungus ve bakterilerdir. Mikrobiyal kaynaklardan özellikle bakterilerin, kolay ve hızlı üremesi, diğer kaynaklara göre çok yönlü ve üretken olması, sürekli kültürde biyoreaktör olarak çalışmasına izin veren yapısı yanında kolay gen manipülasyonu gibi pek çok avantajı bulunmaktadır. Bu nedenlerle bakteriler pigment üretimi ve biyoteknolojik çalışmalar için çok daha fazla tercih edilmektedir. Bakteriyel pigmentlerin doğal renklendiriciler olarak üretimi ve uygulanması, çeşitli araştırmacılar tarafından çalışılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Ahmad *et al.* 2013). Yapılan araştırmalar bakteriyel pigmentlerin kullanım alanlarının ne kadar geniş olduğunu ortaya koymuş ve uygulama alanlarının sadece renkle sınırlı kalmayarak bunun yanında antimikrobiyal, antikanser, antifungal gibi özellikleri de beraberinde taşıdığını

1. GİRİŞ

göstermiştir. *Staphylococcus aureus*, *M. luteus* ve *Malleomyces mallei*'nin sarı, çeşitli *Mycobacteria* suşlarının turuncu, *Prevotella melaninogenicus*'un siyah, *S. marcescens*'in kırmızı, *C. violaceum*'un mor, *Planococcus citreus*'un limon sarısı, *P. aeruginosa*'nın ise yeşil, mavi ve floresans pigmentleri ürettikleri gözlemlenmiştir. Bakterilerin çeşitli karotenoid, melanin, flavin, fenazin, bakteriyoklorofil ve özellikle violacein, prodigiosin ve indigo gibi pigmentlerin üreticisi oldukları bilinmektedir (Dufosse 2009).

Çizelge 1.1. Pigment Üreten Bakteriler

Bakteri İzolatları	Pigment/Molekül	Renk
<i>Agrobacterium aurantiacum</i>	Astaksantin	Pembe – Kırmızı
<i>Paracoccus carotinifaciens</i>	Astaksantin	Pembe – Kırmızı
<i>Bradyrhizobium specie</i>	Kantaksantin	Koyu Kırmızı
<i>Flavobacterium specie</i>	Zeaksantin	Sarı
<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>		
<i>Achromobacter</i>	Zeaksantin	Krem
<i>Bacillus sp.</i>	Zeaksantin	Kahverengi
<i>Brevibacterium specie</i>	Zeaksantin	Turuncu, Sarı
<i>Corynebacterium michigannise</i>	Zeaksantin	Grimsi Krem
<i>Corynebacterium insidiosum</i>	Indigoidine	Mavi
<i>Rugamonas rubra</i> , <i>Streptoverticillium rubrireticuli</i> , <i>Vibrio gaogenes</i> , <i>Alteromonas rubra</i>	Prodigiosin	Kırmızı
<i>Rhodococcus maris</i>	Astaksantin	Mavimsi kırmızı
<i>Xanthophyllomyces dendrorhous</i>		Pembe - Kırmızı
<i>Haloferax alexandrinus</i>	Kantaksantin	Koyu Kırmızı
<i>Staphylococcus aureus</i>	Stafilyloksantin, Zeaksantin	Altın Sarı
<i>Chromobacterium violaceum</i>	Violacein	Mor
<i>Serratia marcescens</i> , <i>Serratia rubidaea</i>	Prodigiosin	Kırmızı
<i>P. aeruginosa</i>	Piosianin	Mavi – Yeşil
<i>Xanthomonas oryzae</i>	Ksantomonadin	Sarı
<i>Janthinobacterium lividum</i>	Violacein	Mor

1.4.1. *Micrococcus* Türleri

Micrococcus türleri (*M. agilis*, *M. antarcticus*, *M. halobius*, *M. kristinae*, *M. luteus*, *M. lylae*, *M. nishinomiyaensis*, *M. roseus*, *M. sedentarius*, *M. varians*) genellikle toprak, su, insan ve hayvan deri tabakasında bulunan fırsatçı patojendir. *Micrococcaceae* familyasına ait hareketsiz, katalaz (+), oksidaz genellikle (+) ancak bazı türlerinde (-) olan Gram pozitif ve kok şekilli bakterilerdir. Sarı veya kırmızı pigment üretimi yaparlar (Beets 2006).

1.4.1.1. *Micrococcus luteus*

M. luteus insan ve hayvan derisi başta olmak üzere toprak ve suda bulunan Gram pozitif ve spor oluşturmeyen aerobik bakteridir. Suda çözünmeyen ve karakterize edilmiş olan sarı pigment üretimi gözlemlenmiştir. Son dönemlerde fırsatçı patojen olarak kabul edilen endokardit, sepsis, septik şok, septrik artrit, menenjit ile ilişkilendirilmiştir (Greenblatt *et al.* 2004).

1.4.2. *Paracoccus* Türleri

Paracoccus türleri (*P. marcusii*, *P. denitrificans*, *P. pantotrophus*, *P. halodenitrificans*) Gram negatif, Rhodobacteraceae familyasına ait hareketsiz, kok şekilli, katalaz ve oksidaz (-) bakterilerdir. Turuncu ve sarı renkli pigment ürettiği bilinen bu bakterilerin habitatları su, toprak ve bazı gıda ürünleri (peynirler) olarak bilinmektedir (Gutiérrez *et al.* 2019).

1.4.2.1. *Paracoccus marcusii*

P. marcusii, toprak ve sudan izole edilen kok şekilli Gram negatif bir bakteridir. Bu bakteri fenotipik özellikleri ve büyük miktarlarda ürettiği karotenoidler nedeniyle diğer *Paracoccus* türlerinin birçoğundan farklı olarak bilinmektedir (Harker *et al.* 1998).

1.4.3. *Serratia* Türleri

Serratia türleri (*S. marcescens*, *S. liquefaciens*, *S. plymuthica*, *S. rubidaea*, *S. fonticola*, *S. marnorubra*, *S. proteamaculans* ve *S. odorifera*) genellikle su, toprak ve bitkilerden izole edilebilen fırsatçı patojenlerdir. *Enterobacteriaceae* familyasına ait endospor oluşturmeyen, hareketli ve çubuk şekilli, Gram negatif bakterilerdir. *Serratia* cinsine ait birçok tür, DNaz, lipaz, jelatinaz, hemolizin, kitinaz, kloroperoksidaz, alkalın fosfatazın çoklu izozimleri ve proteazlar gibi birçok virülans faktörü salgılayanın yanı sıra karbapenem antibiyotikleri, prodigiosin adı verilen kırmızı bir pigment ve biyosümfaktanlar da üretmektedirler (Horinouchi *et al.* 2010).

1.4.3.1. *Serratia marcescens*

S. marcescens, toprakta ve suda doğal olarak oluşturduğu kırmızı pigmentleri nedeniyle dikkat çekmiş ve oluşturduğu bu pigment nedeniyle bir dönem biyolojik enfeksiyon belirteci olarak kullanılmıştır. Sporodik enfeksiyonların yanı sıra son 30 yıldır ciddi komplikasyonlara neden olan nazokomiyal enfeksiyon ajanı olarak bilinen *S. marcescens*'in idrar ve solunum yolu enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit, septisemi, yara enfeksiyonları, göz enfeksiyonları ve menenjit ile ilişkili olduğu da gözlenmiştir.

1.4.3.2. *Serratia plymuthica*

İlk olarak 1896'da Lehman ve Newman tarafından *Bacterium plymuthicum* olarak tanımlanan *S. plymuthica* sonradan *Serratia* cinsine alınmıştır (Farmer *et al.* 1985). *S. Plymuthica* da *Enterobacteriaceae* familyasına ait endospor oluşturmeyen, hareketsiz ve çubuk şekilli, Gram negatif bir bakteri türüdür. Saprofit fermentatif bir tür olan *S. plymuthica* üretmiş olduğu kırmızı renkli prodigiosin ile dikkat çekmektedir. Habitatı su olarak bilinmesine rağmen topraktan, bitkilerden, böceklerden hatta klinik örneklerden dahi izole edilebilmektedir. İnsanlarda çok nadiren bulunan *S. plymuthica*'nın bazı sporadik enfeksiyon vakalarına da neden olduğu bilinmektedir (Grimont and Grimont 2006).

1.4.2. Doğal Boyaların Kullanım Alanları

Sentetik boyalarda kullanılan bazı kimyasal bileşiklerin toksik, mutajen, kanserojen ve alerjik olmaları nedeniyle günümüzde toksik olmayan, güvenilir ve canlı organizmalardan kolay elde edilen doğal bileşiklere ve boyalara olan ilgi artmıştır. Bu bağlamda doğaya ve canlılara olumsuz etkileri olmayan hatta canlılarda antimikrobiyal, antioksidan ve antitümör özelliklerine sahip doğal boyalar tercih nedeni olmuştur. Özellikle gıda, tekstil ve boyaların yoğun olarak kullanıldığı farklı endüstriyel sektörlerde renklendirici olarak bu boyaların kullanımı artmış ve alternatif doğal boya üreticileri aranır olmuştur.

Gıda sektöründe boya ve pigmentler; yeni gıdaların üretilmesinde, gıdaların imalatında veya depolanmasında olası renk değişimlerini düzeltmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanında gıda boyaları, var olan doğal rengi arttırmak veya kaybolan rengi yerine koyarak gıdanın özelliğini korumak, üründe standart bir renk oluşturmak, farklı bir renk veya değişik renk tonları vermek noktasında kalite düşüklüğünü gizlememek koşuluyla da kullanılmaktadır (Atlı 2010). Gıda sektöründe; mandıracılıkta süt ve süt ürünlerinin lezzet ve renk olarak modifiye edilmesinde, dondurmaların ve gıda ürünlerinin (yoğurt, puding, süt içecekleri, tatlılar, şekerlemeler, fırın ürünleri ve reçeller) renklendirilmesinde, bazı durumlarda da koruyucu gıda maddesi olarak kullanılabilir. Çeşitli pigment üreten mikroorganizmalar arasından *Monascus ruber*'in toksik olmadığı ve gıdalarda renklendirici yanında yiyecek lezzetini artırarak koruyucu özellikte sağladığı bildirilmiştir (Vidyalakshmi *et al.* 2009). Bunun gibi pek çok organizma ürünü bu amaçla kullanılmaktadır. Yine balıkçılık sektöründe sucul hayvanların kalite özelliklerini ve albenilerini artırmak için de bazı boyalar koruyucu olarak tercih edilmektedir. Balık, karides ve bazı mikroalglerde bulunan karetonoid üyesi kırmızı bir pigment olan astaksantin tropikal süs balıklarının renklerinin korunmasında (Ako *et al.* 2000), kümes hayvanları endüstrisinde yumurta sarılarının renklendirilmesinde (Inberr 1998) kullanılan antioksidan özelliği güçlü pigmentlerden birisidir.

Endüstriyel sektörde özellikle baskı endüstrisinde renk verici boya olarak kullanımları yanında, püskürtmeli yazıcılar için renk giderici olarak da doğal boyalar

kullanılmaktadır. Endüstriyel sektörde kağıtların yeniden kullanılmak istenmesi, böylelikle orman kaynaklarının korunarak geri dönüşümün hızlandırılması için, kağıtlar üzerine yazılı olan harflerin ve görüntülerin basılı kağıtlardan kolayca kaybolması amacıyla ışık ile muamele edildiğinde çözülebilir mürekkepler tercih edilmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışmada gıdalarda boya maddesi olarak da kullanılan *Monascus* cinsine ait pigmenti kullanılmış, görünür ışığa ve/veya ultraviyole ışığına maruz kaldığında basılan karakterlerin ve/veya görüntülerin çabucak çözülmesi sağlanırken, karanlıkta tutulduğunda ise renklerin korunumu mümkün olabilmektedir (Tsuyoshi *et al.* 2004).

Doğal boyaların en çok tercih edildiği bir diğer alanda tekstil endüstrisidir. Sentetik boyaların içerdiği kimyasallar nedeniyle cilt kanseri ve alerjik reaksiyonlar gibi insan sağlığını tehdit eden birçok probleme neden olmaktadır. Buna rağmen sentetik boyaların sıcaklık ve ekstrem koşullarda bile dayanıklı ve kararlı olması, sentezlenmesinin ve üretilmesinin kolay ve maliyetinin de düşük olması nedeniyle tekstil endüstrisinde özellikle tercih edilmektedirler. Bunun yanında tekstil endüstrisinde kullanılan boyalar çok miktarda atık oluşturmakta ve oluşan bu atıkların büyük bir kısmı sulara boşaltılarak suların kirlenmesine neden olmaktadır. Sentetik boyaların dayanıklılık özelliklerinin yüksek olması nedeniyle bu atık suların arıtılması oldukça güç olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı dünya çapında özellikle tekstil endüstrisinde doğal kaynaklı boyalar için talep hızla artmaktadır (Srikanlayanukul *et al.* 2006). Tekstil ürünlerinde doğal boyalar kullanılarak yapılan pek çok çalışma mevcuttur.

1.4.3. Doğal Boyaların Kullanımını Sınırlayan Faktörler

Doğal boyaların sağlığa zararlı olmaması bir tercih nedeni olsa da üretim masraflarının fazla olması kullanımını önemli ölçüde sınırlamaktadır. Yine üretilen bazı boyalar işleme sırasında sentetik boyalar gibi kalıcılığa sahip olamamakta, ışığa maruz kaldıklarında solmakta ve yüksek ısı ve asiditeye karşı düşük direnç göstermektedirler. Boyaların belli pH aralıklarında renk verme yetilerini korudukları ancak optimal sınırların dışında ki pH'larda farklı renkler oluşturabildikleri bilinmektedir. Bazı boyalar (antosiyantinler) aside karşı çok dayanıklı olup düşük pH ortamlarında (pH 2,5-

1. GİRİŞ

3,2), bazıları da (karotenoidler) geniş pH (2,5-7,5) aralığında renk verme yeteneğini koruyabilmektedirler. Düşük pH aralığında aktivitesi yüksek olan ve kuvvetli kırmızı renk veren antosiyaninler, pH'nın 4,5 a kadar yükselmesi durumunda (depolama ya da ısı uygulamalarında) mor/mora yakın tonlar almakta ve bu durumda pigmentasyon sırasında renk maviden sarıya dönüşmektedir. Ancak farklı kaynaklardan elde edilen mor mısır antosiyaninlerinin pH'6 ya kadar kırmızı rengini muhafaza ettiği bilinmektedir (Atlı 2010).

Doğal pigmentlerin dayanıklılığını etkileyen diğer parametreler; oksijen, sıcaklık, metaller ve diğer bazı katkı maddeleridir. Doğal pigmentler kimyasal yapılarından dolayı oksidasyona karşı oldukça hassastır, bu nedenle üretimleri esnasında antioksidan ilavesi gerekebilmektedir. Doğal boya maddelerinin bazıları farklı ısılarda kararlılığını korusa da (örneğin antosiyaninler ve karotenoidler yaklaşık 100°C ısıya kadar dayanıklı, koşnil, ısıya dayanıklılığı en yüksek) bazıları ısıya karşı oldukça hassas (pancar kırmızısı) olabilmektedirler. Metaller özellikle de demir ve bakır çoğu pigmentin renksizleşmesine ve istenmeyen renklerin oluşmasına neden olabilmektedir. Yine bazı metallerin karotenoidler ve betasiyaninlerin katalize edilmesini azalttığı bilinmektedir. Özellikle gıda boyalarında bazı koruyucu katkı maddelerinin kullanımı (SO₂ ve askorbik asit) renk maddelerinin kararlılığını etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda SO₂'in, antosiyaninlerin düşük konsantrasyonlarında kararlılıklarını korumalarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Atlı 2010).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Çalışmanın ana temasını oluşturan mikrobiyal pigmentler ve bunların uygulanma alanları ile ilgili literatür taramasının sonuçları aşağıda sıralanmıştır:

Alihosseini *et al.* (2008), deniz sedimentlerinden izole ettikleri *Vibrio sp* türlerinin parlak kırmızı pigment ürettiğini tespit ederek bu pigmenti elektrosprey iyonizasyon kütle spektrometresi (ESI-MS) ve nükleer manyetik rezonans (NMR) ile karakterize etmişlerdir. Karakterizasyon sonucunda düşük moleküler ağırlıklı polar olmayan yapıya sahip pigmentin prodiginin olduğunu ve bu pigment ile kumaşların boyanabildiğini ve boyadıkları kumaşların antibakteriyel aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir.

Büyüksırt ve Kuleaşan (2013), çeşitli kaynaklardan renk maddesi üreten mikroorganizmaları izole ederek 16S ve 18S ribozomal DNA dizi analizi ile tanılamışlardır. Tanı sonucunda kavuniçi renk üreticisi *Rhodotorula glutinis*, pembe renk üreticisi *Sporobolomyces roseus*, sarı renk üreticisi *Cellulosimicrobium funkei* ve kırmızı-turuncu renk üreticisi *Dietzia natronolimnaea* olarak tanılanmıştır. İzole ettikleri organizmaların ürettiği pigmentleri uygun çözücüler kullanarak ekstrakte etmiş ve saflaştırmışlardır. Saflaştırmış oldukları pigmentlere kararlılık testleri uygulamışlar, ışık ve buzdolabında beklettikleri pigmentlerde renk değişimi olmadığını gözlemlemişlerdir. Optimum pH değerleri 5-7 arasında tespit edilen pigmentlerin ışık ve FT-IR spektroskopisinde spektrum analizleri yaparak kimyasal yapıları aydınlatılmıştır. Aynı zamanda saflaştırılan pigmentler dondurma üretiminde renk verme amacıyla uygulanarak kararlılığı çalışılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.

Kramar *et al.* (2013), *Streptomyces* cinsine ait koyu mavi ile koyu kırmızı renk pigment üreten iki ayrı izolatin (NP2 ve NP4) ham misel ekstraktlarını elde ederek, tekstil boyama da doğal renklendirici olarak kullanılma imkanlarını araştırmışlardır. Çalışmada kullanılan ekstrelerin NMR yöntemi ile analizleri sonucunda prodigison benzeri bileşikler içerdiği tespit edilmiş olup, her iki ekstrenin de farklı tekstil liflerine karşı farklı boyama yetenekleri olduğu bildirilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sumathi *et al.* (2013), balık bağırsağından izole ettikleri bakteri izolatlarının prodigiosin üretim yeteneklerini araştırdığı çalışmalarında, tabakhane katı atık eti kullanarak prodigiosin üretimini arttırmayı amaçlamış ve aynı zamanda elde ettikleri prodigiosinin farmakolojik etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında maksimum prodigiosin elde etmek için fermantasyon koşullarını optimize ederek elde ettikleri pigmentin FTIR, NMR, ESI-MS, TGA ve DSC kullanarak enstrümantal analizini gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalarının sonucunda, 30°C sıcaklık, pH 8 ve %3 substrat konsantrasyonunun sağlanması halinde 30 saat içerisinde izolatların maksimum prodigiosin ürettiğini tespit etmişlerdir. Çalışmada üretilen pigmentlerin terapötik etkinlikleri, *in-vitro* antimikrobiyal ve antikanser çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

Indra *et al.* (2014), yüksek karotenoid pigment üretim kapasitesine sahip farklı ortamlardan aldıkları kırk bir toprak örneğinden izolasyonlar yapmışlar ve bu izolasyonlar sonucunda sarı renkli pigment oluşturan 24 izolat elde etmişlerdir. Bu izolatlardan metanol ekstraktı kullanarak elde edilen pigmentler spektrofotometrik analizler ile değerlendirilmiş ve 450 nm'de oluşan pikler, karotenoid pigmentinin varlığını göstermiştir.

Chandran *et al.* (2014), *Bacillus subtilis*, *Enterococcus hirae*, *Acinetobacter mufti* ve *P. aeruginosa* izolatlarının pigmentlerini araştırdıkları çalışmalarında; *P. aeruginosa*'nın 37°C optimum sıcaklıkta 72 saatte maksimum oranda ve çeşitli renklerde pigment ürettiğini gözlemlemişlerdir. Kloroform ile ekstrakte ettikleri pigmentleri, UV spektrofotometre ve HPLC ile analiz etmişler, aynı zamanda DPPH testi ile de antioksidan aktivite çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Bu analizler sonucunda pigmentin piosyanin olduğu ve bu pigmentin antioksidan ve antimikrobiyal özelliği olan gıda renklendiricisi olarak kullanılabilceği sonucuna varmışlardır.

Yolmeh *et al.* (2016), ultraviyole (UV) ışınları ile *Micrococcus roseus*'tan elde edilen doğal pigment üretiminin artırılmasına yönelik yapmış oldukları çalışmada, ışınlama süresi (10-80 s), ışınlama mesafesi (5-45 cm), inkübasyon sıcaklığı (5-35 ° C) ve inkübasyon süresi (12-72 s) olmak üzere dört bağımsız değişken parametresinin doğal pigment üretimi üzerindeki etkisini değerlendirmek için tepki yüzeyi metodolojisini (RSM) kullanmışlardır. Çalışmanın sonucunda, en uygun doğal pigment

2. KAYNAK ÖZETLERİ

üretiminin 15.67 s ışınlama süresi, 30,45 cm ışınlama mesafesi, 21.36°C inkübasyon sıcaklığı ve 47.76 saat inkübasyon süresinin olduğu koşullarda gerçekleştiği tespit edilmiştir. Parametrelerin optimal değerlerde olması durumunda toplam karotenoid (TC) miktarı 7,20 mg/L, biyokütle kuru ağırlığı (BDW) ise 7,17 g/L olarak belirlenmiştir. Çalışmanın sonucunda optimal şartlar altında deneysel değerler ile öngörülen değerlerin birbiriyle uyumlu olduğu ve UV ışınlarının *M. roseus*'tan pigment üretimini arttırmak için etkili bir yöntem olduğu görülmüştür.

Samyuktha *et al.* (2016) tarafından yapılan bir çalışmada, topraktan izole edilen bakteri izolatlarından 3 tanesinin pigment ürettiği tespit edilmiş olup bu pigmentlerin ekstraksiyonu, antibakteriyel özelliği ve *Vigna radiata* (Maş fasülyesi) tohumlarının çimlenmesi üzerine etkileri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan bakteri izolatlarının 10°C'nin altındaki sıcaklıklarda ve nötral pH değerlerinde 48 saatte maksimum pigment ürettiği gözlenmiştir. İzole edilmiş pigmentlerin, 440 nm'de maximum emilim gösterdikleri için karotenoidler olabileceği bildirilmiştir. Ayrıca pigmentlerin *V. radiata* tohumlarının çimlenmesi ve 5 farklı bakteri türüne (*E. coli*, *Pseudomonas* sp, *Klebsiella* sp, *Proteus* sp, *Staphylococcus* sp.) karşı da antibakteriyel etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

Suryawanshi *et al.* (2017) yapılan çalışmada, çeşitli pigmentli bakterileri, Marigold çiçekleri, havuç, bahçe toprağı ve domateslerden izole etmişlerdir. Yoğun pigment üretme kapasitesi gösteren, altı bakteri suşu izole edilmiştir. İzolatlar çeşitli biyokimyasal testlere tabi tutulmuştur. Bu bakteriyel izolatlar biyolojik ve tekstil boyalarını bozma yetenekleri bakımından test edilmiştir. Bakteriyel izolatlar ayrıca hidrokarbon parçalama kapasitesi ve amilaz, beta-galaktosidaz, lipaz, pektinaz ve selülaz gibi hücre dışı enzimlerin üretimi için de test edilmiştir. Ayrıca pigmentler fenolik aktivite, antioksidan kapasite ve antibakteriyel aktivite göstermiştir.

Shetti *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmada, pigment üreten bakteriler topraktan izole edilerek tanılanmış ve pigment üretimi gözlenen bakterilerden ekstraksiyon yapılarak pigmentlerin antibakteriyel potansiyeli araştırılmıştır. Pigment üreten izolat morfolojik ve biyokimyasal analizler sonucunda *Serratia* sp. olarak tanılanmış ve bu izolatın ürettiği kırmızı pigmentin *S. aureus*, *E. coli*, *P.*

2. KAYNAK ÖZETLERİ

aeruginosa gibi patojen bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu belirtilmiştir.

Trivedi *et al.* (2017), pirinç tarlasından almış oldukları toprak örneklerinden pigment üreten bakterileri izole ettikleri çalışmalarında, üç çözücü (metanol, n-hekzan ve etil asetat) kullanarak bakterilerden pigment izolasyonu yapmışlar ve izole ettikleri pigmentlerin karakterizasyonu için Fourier dönüşümü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) tekniğini kullanmışlardır. Pigment oluşturan bakteriyel izolatın, 16S rRNA gen dizisi analizi ile yapılan tanısı sonucunda *B. subtilis* olduğu tespit edilmiş olup, üretmiş olduğu pigmentin FTIR analizi sonucunda standart olarak kullanılan beta karoten ile benzerlik gösterdiği ve dolayısıyla pigmentin karotenoid türevi olduğu tespit edilmiştir.

Srimathi *et al.* (2017), pigment üreten mikroorganizmalar toprak örneklerinden izole edilmiştir. Biyokimyasal olarak tanımlanmış ve *S. marcescens* olduğu bulunmuştur. Prodigiosin üretimi, pH, sıcaklık, inkübasyon, farklı ortamlar, azot kaynağı, şeker substratları gibi farklı çevresel parametrelere göre optimize edilmiştir. Ham pigment ekstresi, ince tabaka kromatografisiyle daha da saflaştırılmıştır. Prodigiosin, boyama, antibakteriyel ve antifungal aktivite gibi çeşitli uygulamalar için test edilmiştir. Bu nedenle pamuklu kumaşta boyanmış renk tonu iyi olduğu için, prodigiosin pigmentinin tekstil ürünlerinin büyük ölçekli üretimde boyanması için önerilebilecek olan pigmentin kimyasal boyalar için bir alternatif olmasını sağlayacağı düşünülmüştür. İnsan serviks karsinom hücrelerinde *S. marcescens* pigmentinin kanser önleyici aktivitesi üzerine gelecekte çalışmaların yapılacağı düşünülmüştür.

Gondil *et al.* (2017), *Serratia nematodiphila* RL2 izolatından prodigiosinin üretimini etkileyen çeşitli fizikokimyasal parametrelerin rolünü belirleyerek optimize ettiği çalışmalarında, besin ortamına ilave edilen laktöz ve maya ekstraktının her birinin %1 konsantrasyonunda, bakteri üremesinin (10,25-4,6 mg / ml DCW) ve pigment üretiminin (0,46-0,6 mg) ortalama %65 oranında arttığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada prodigiosinin, *Listeria sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Yersinia sp.* ve *Shigella sp.* gibi patojen organizmalara karşı antimikrobiyal özelliğinin test edildiği ve olumlu sonuçlar alındığı rapor edilmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Kenawy *et al.* (2018), *S. marcescens*'in büyümesi için karbon kaynağı olarak yerel biyodizel tesisinden elde edilen ham gliserol kullanarak pigment üretimi için optimal koşulları incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucunda maksimum üretimin (870 ünite/hücre) pH 9'da 22°C'de 6 günlük inkübasyondan sonra %1 (g/ml) pepton ilavesiyle gerçekleşebildiğini ve gama ışını ile optimize edilmiş koşullar kullanılarak pigment üretiminin iki katına çıkarılabileceğini göstermişlerdir.

Meenakshi *et al.* (2018), sıcak su kaynaklarından almış oldukları numunelerden (40°C ve pH 7,0 olan Luria Bertani besiyerinde 72 saatlik inkübasyon sonucunda) pigment üreten iki bakteri (M1 (Sarı) ve MS2 (Turuncu)) izole etmişlerdir. İzole ettikleri M1 izolatu için pepton (%0,5) en iyi karbon kaynağı, MS2 izolatu için ise potasyum nitrat (%0,5) en iyi azot kaynağı olarak bulunmuştur. Spektral analizde 437 nm'de maksimum absorpsiyon gösterdiğinden pigmentlerin karotenoidler olduğu rapor edilmiştir.

Abraham and Chauhan (2018) tarafından yapılan çalışmada, topraktan izole edilerek tanımlanan *Streptomyces sp.*'nin ürettiği undesilprodigiosinin antimikrobiyal aktivitesi test edilmiştir. Çalışmanın sonucunda pigmentin test edilen izolatlardan *Salmonella sp.*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sp.* ve *Enterococcus sp.*'ye karşı etkili, *S. aureus*, *Klebsiella pneumonia* ve *E. coli*'ye karşı daha az etkili olduğu bildirilmiştir. Çalışmada aynı zamanda undesilprodigiosinin antikanser aktivitesi HeLa hücre hatlarına karşı test edilmiş ve IC50 değeri 145 µg/ml olarak tespit edilerek güçlü bir sitotoksik etkisinin olduğu belirtilmiştir. Mevcut araştırma ile, *Streptomyces* izolatının ürettiği undesilprodigiosinin, etkili farmasötik özelliklere sahip güçlü bir biyoaktif metabolit olduğu ortaya koyulmuştur.

Tandale *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışma, Maharashtra bölgesinden izole edilen actinobacteria'dan hücre içi pigmentin izole edilmesine odaklanmıştır. İki *actinomycetes* suşundan yeşil ve turuncu renkte pigment izole edilmiştir. İzolatların biyokimyasal karakterizasyonu da incelenmiştir. Pigment büyük ölçekli üretim için MGYP seçildi. Ayrıca hücre içi pigment izolasyonu için çözücü olarak etil asetat kullanılmış kısmen saflaştırılmıştır. Kısmi pigmentlerin karakterizasyonları, UV-görünür spektrofotometre ve FTIR analizi kullanılarak tespit edilmiştir. Ekstre edilen

2. KAYNAK ÖZETLERİ

pigment Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı belirgin antibakteriyel aktivite göstermiştir. Çıkarılan pigment ayrıca antioksidan aktivite açısından analiz edilmiştir. Antimikrobiyal ve güçlü antioksidan aktivite açısından elde edilen sonuçlar geniş spektrum göstermiştir. Doğal bir pigment kaynağı olarak bu pigmentler tekstil boyama ve dudak kremi üretimi için kullanılmıştır.

Chandra *et al.* (2018) Hint ve Carnatic müziğindeki çeşitli müzikal titreşimlerin, mikroorganizmaların büyümesi ve metabolit üretimi üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında, tollywood müziğinin (Iddarammayilatho filminden 600-1000 Hz ses frekansındaki Top lesi poddi şarkısı, ve Guna filminden 100-600 Hz ses frekansına sahip olan Priyathama Neevachata Kushalama) etkisinin taranması için yapılmıştır. 600-1000 Hz arasında değişen ses frekansının, sarı pigment üreten *Brevibacterium sp.* biyokütlesinde ve pigment üretiminde ciddi artışa neden olduğunu bildirmişlerdir.

Doğal boya olarak maden cevherleri, bitkiler, böcekler ve bazı mikroorganizmaların kullanıldığı literatürde çok sayıda çalışma olmasına rağmen ülkemizde tekstil alanında bakterilerden elde edilen doğal boyaların kullanıldığı az sayıda çalışma olduğu ve bu anlamda doğal boya üretiminde bakterilerin gözardı edildiği fark edilmiştir. Bu alandaki boşluğu doldurmak ve doğal boyalara olan talebi karşılamak amacıyla çalışmamızda pigment üreten bakteriler tespit edilerek bu bakterilerden pigmentler izole edilmiş ve kumaş boyası olarak kullanımları test edilmiştir. Aynı zamanda boyama yeteneği gözlenen bu pigmentlerin insan sağlığına etkisi de çeşitli toksisite testleri ile araştırılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu tezin ana materyalini önceki çalışmalarda izole edilen ve pigment ürettiği bilinen ancak tanılanmamış bakteriyel izolatlar oluşturmaktadır.

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Tez kapsamında kullanılan cihazlar ve modelleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1 Sarf Malzemeler

CİHAZ	MARKA
Buzdolabı	Edesa
CO ₂ 'li İnkübatör	Esco
Çalkalamalı İnkübatör	Zhicheng-Zhwy-2102c
Derin Dondurucu (-20)	J.P. Selecta
Derin Dondurucu (-86)	Esco, Uus-439b
Elektroforez tankı	Biorad-yatay
Güç kaynağı	Biorad, PowerPac
Hassas Terazi	Shimadzu
Isıtıcı Blok	Bioer
Isıtlıcılı Manyetik Karıştırıcı	Daihan, Shr
Masaüstü Ph Metre	Adwa, AD1000
Mikrodalga Fırın	Vestel
Mikroskop	Zeiss, Prima Star
Nanodrop Spektrofotometre	Thermo Scientific Multiskan Go
Otoklav	JSR, Jsac-60
PCR Cihazı	Sensoquest
Saf su cihazı	GFL
Santrifüj	Hettich Zentrifugen Universal 320R
Spektrofotometre	Biotek EPOCH
Steril Kabin	Esco NordicSafe™ Class II Biological Safety Cabinet
Su Banyosu	Daihan
Terazi	Desis, NHB
Ultra Saf Su Cihazı	Millipore, Q-3w
Vorteks	Wisd Wisemix VM-10
Evaporatör	Scilogex RE-100 Pro

3.1.2. Kullanılan Besiyerleri ve Çözeltiler

%3'lük H₂O₂ çözeltisi: 3 ml H₂O₂'nin hacmi steril dH₂O ile 100 ml ye tamamlanmıştır (Lelliot *et al.* 1966).

%30'luk Gliserol: 70 ml steril distile su (dH₂O) üzerine 30 ml gliserol ilave edilerek hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (Klement 1990).

%70'lik Etil alkol: 70 ml saf etil alkolün hacmi steril dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. Karışım kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Klement 1990).

%95'lik Metil Alkol: 95 ml saf metil alkolün hacmi steril dH₂O ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.

10X Phosphate Buffered Saline (PBS) pH 7.0 Çözeltisi: 80,0 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na₂HPO₄ ve 2,4 g KH₂PO₄ tartılarak 800 ml distile su içerisinde çözdürülmüş, HCl ile pH 7.4'e ayarlandıktan sonra toplam hacim su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan PBS çözeltisi otoklavda sterilize edilip oda sıcaklığında saklanmıştır.

1M IPTG (Isopropylthio-β-D-galactosidase): 2,38 g IPTG, 8 ml ddH₂O'da çözdürülerek son hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 0,22 µm çapında milipor filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır (Baltacı 2015).

1X TAE tamponu (Tris-Asetat tamponu): 100 ml 10X TAE tamponu 900 ml steril dH₂O ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır. (Görmez 2011).

6X yükleme tamponu: %100'lük 40 ml gliserol, 0,1 g bromfenol blue ile karıştırılarak son hacmi 1XTAE ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım otoklavda sterilize edildikten sonra +4°C'de muhafaza edilmiştir (Görmez 2011).

3. MATERYAL ve YÖNTEM

Amfisilin çözeltisi: 20 mg amfisilin, 1 ml ddH₂O'da çözdürülerek hazırlanmıştır. Hazırlanan karışım 0,22 µm çapında milipor filtreden geçirilerek sterilize edilmiş ve kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır (Baltacı 2015).

Amfisilinli LB Agar: 250 ml LB Agar hazırlandıktan sonra sıcaklık yaklaşık 50°C'ye geldiğinde 250 ml LB Agar için, 100 mg/ml'lik amfisilinden 250 µl ilave edilmiş ve homojen hale getirildikten sonra petrilere dökülmüştür (Öztaş 2017).

Etidyum bromür çözeltisi: 1 g etidyum bromür (10 mg/ml), 100 ml distile su (dH₂O) içerisinde iyice çözdürülerek hazırlanmış ve hazırlanan karışım karanlıkta oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir (Adiguzel vd. 2006).

Kalsiyum klorür çözeltisi: 1,11 gr CaCl₂, 100 ml dH₂O'da çözdürülerek otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir. Hazırlanan çözelti kullanılmaya kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir (Baltacı 2015).

Kristal viyole çözeltisi: 100 ml steril distile su (dH₂O) içerisine 0,5 g kristal violet ilave edilerek hazırlanmıştır.

Luria Bertani (LB) Agar: (Bileşeni (g/L); Tryptone: 10,0, Yeast Extract: 5,0, Sodium Chloride: 10,0, Agar: 15,0) 1L distile su (dH₂O) içerisine 35 g Luria Bertani Agar ilave edilerek hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilerek soğutulduktan sonra petrilere dökülmüştür (Lelliott and Stead 1987).

Luria Bertani (LB) Broth: (Bileşeni (g/L); Tryptone: 10,0, Yeast Extract: 5,0, Sodium Chloride: 10,0) 20 g Luria Bertani Broth karışımı 1 L distile su (dH₂O) içerisinde çözdürülerek, hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (Lelliott and Stead 1987).

Lügol Çözeltisi: 1 g iyot ve 2 g KCl tartılarak, toplam hacim steril distile su (dH₂O) ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır (Klement 1990).

Nutrient agar (NA): (Bileşeni (g/L); Agar: 12,0, Peptone: 5,0, Beef Extract: 3,0, Sodium Chloride: 8,0) 1 L distile su (dH₂O) içerisine 28 g Nutrient Agar ilave edilerek hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilerek soğutulduktan sonra petrilere dökülmüştür (Lelliott and Stead 1987).

Nutrient broth (NB): (Bileşeni (g/L); Beef Extract: 1,0, Yeast Extract: 2,0, Peptone: 5,0, Sodium Chloride: 5,0) 13 g Nutrient Broth karışımı 1 L distile su (dH₂O) içerisinde çözdürülerek, hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilmiştir (Lelliott and Stead 1987).

Proteinaz K: 1 ml steril distile su (dH₂O) içerisine 20 mg proteinaz K ilave edilerek hazırlanan karışım kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Stead *et al.* 1998).

Triptic Soy Agar (TSA): (Bileşeni (g/L); Tryptone: 15,0, Soy Peptone: 5,0, Sodium Chloride: 5,0, Agar: 15,0) 40 g Triptic Soy Agar karışımı 1 L distile su (dH₂O) ilave edilerek hazırlanan karışım otoklavda 121°C'de 15 dk sterilize edilerek soğutulduktan sonra petrilere dökülmüştür (Klement 1990).

X-gal solüsyonu (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside): 1 ml dimetilformamid içerisinde 40 mg X-gal çözdürülerek hazırlanan karışım kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir (Baltacı 2015).

3.2. Yöntem

3.2.1. Pigment Üreten Bakterilerin Seçimi

Araştırma kapsamında önceki çalışmalarda izole edilen ve kültür koleksiyonumuzda bulunan izolatların pigment üretme yeteneklerinin tespiti amacıyla çeşitli besiyerlerine (NA, TSA, LBA) ekimleri yapılmıştır. Ekimi yapılan izolatların besiyerlerinde oluşturdukları renk değişimleri gözlenmiş ve pigment oluşturanlar seçilerek çalışmalar bunlar üzerinden yürütülmüştür.

3.2.2. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. Hücre Morfolojisi Testi

Pigment üreten izolatların hücre şekillerini belirlemek amacıyla ilk olarak basit boyama yapılmıştır. Bu amaçla, bakteri kültürü lam üzerine aktarılıp hava ile teması sonucunda kısa bir süre kurutulmuş ve alevden geçirilerek fiksasyon işlemi yapılmıştır. Bu işlemden sonra lam üzerine kristal viyole solüsyonu ilave edilerek, birkaç dk bekledikten sonra, saf su ile yıkanıp kurutulmuş ve mikroskop altında inceleme yapılmıştır (Saygılı 1995).

3.2.2.1. Gram Boyama

NA besiyerinde geliştirilen bakteri kültürlerinden öze yardımıyla alınarak serum fizyolojik ile lam üzerine yayılmış ve lam ateşten geçirilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen preparatlar üzerine önce kristal viyole boya solüsyonu ilave edilip 2 dk beklenmiştir. Süre sonunda preparat sudan geçirilerek lügol solüsyonu ilave edilmiş ve 1 dk beklenmiştir. Süre sonunda deklorizasyon işlemi için su ile yıkama yapıp %96'lık etil alkol ile 15-20 sn. muamele edilmiştir. Su ile yıkama yapıp son olarak sulu fuksin boyası ilave edilerek 2 dk beklenmiş ve preparat yıkanarak boya kalıntıları uzaklaştırılmıştır. Kurutma işlemi yapıldıktan sonra mikroskopta inceleme gerçekleştirilmiştir (Harley 2002; Özkan 2009).

3.2.2.3. Hareketlilik Testi

Hareket testi yapılacak bakteriler NB besiyerinde geliştirilmiş ve geliştirilen taze sıvı kültürden bir öze dolusu alınarak lamelin ortasına aktarılmıştır. Lamelin dört köşesine çok az miktarlarda vazelin sürülüp çukur lam ters çevrilerek çukur kısmı kültürün üzerine gelecek şekilde kapatılmıştır. Lam ile lamel arasında kalan sıvı kültürün asılı halde kalıp kalmadığı kontrol edilmiş ve hazırlanan asılı haldeki damla preparatı mikroskopta incelenmiştir (Öztaş 2018).

3.2.3. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.3.1. Katalaz Testi

Katalaz enzimi, hücreler için zararlı olan hidrojen peroksit (H₂O₂)'i parçalayarak su ve oksijene dönüştüren bir enzimdir. Katalaz enziminin aktivitesini belirlemek için, 18-24 h geliştirilen bakteri izolatlarından öze yardımıyla alınan örnekler üzerine %3'lük taze hazırlanmış hidrojen peroksit ilave edilmiştir. Oksijen çıkışı nedeniyle kabarcıklar oluşması durumu katalaz pozitif, oluşmaması ise katalaz negatif olarak değerlendirilmiştir (Klement *et al.* 1990).

3.2.3.2. Oksidaz Testi

Oksidaz testi, bakteri izolatlarının elektron transferinde görev yapan sitokrom C enzimine sahip olup olmadığını göstermek için uygulanan bir yöntemdir (Acar 2009). Bu test için N, Ndimethyl-1,4-phenylene diammonium dichloride içeren özel stripler kullanılmıştır (Bactident Oxidase). Öze ile alınan bakteri izolatları stribin uç kısmına inokule edilmiş ve bir süre sonra renk değişimi olanlar pozitif olarak değerlendirilmiştir (Harley and Prescott 2002).

3.2.4. Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanılanması

3.2.4.1. Bakterilerden Genomik DNA İzolasyonu

Çalışma kapsamında pigment oluşturan bakteri izolatlarından genomik DNA izolasyonları yapılmıştır. Bu amaçla NA besi ortamında geliştirilen bakteriler özeyle toplanarak eppendorf tüplerine alınmış ve "PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen" protokolüne uygun olarak DNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.2. Bakterilerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması

16S rRNA gen bölgeleri, evrensel primerler (forward primer olarak; 27F=5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTCAG-3' ve reverse primer olarak; 1492R=5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') kullanılarak PCR ile çoğaltılmıştır.

PCR işleminde her bir örnek için, 10X PCR Buffer'dan 5 µl; dNTP mixinden (dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 10 mM) 1 µl; forward ve reverse primerlerden 1'er µl; MgCl₂'dan (50 µM) 4 µl; 5 unit/µl *Taq* DNA polimerazdan 0,5 µl ve ddH₂O'dan 35,5 µl olacak şekilde toplam 48 µl reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Reaksiyon başına 2 µl template DNA eklenerek toplam hacim 50 µl'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilerek, bir reaksiyon döngüsü, 95°C'de 2 dakika, 94°C'de 1 dk, 53°C'de 1 dk, 72°C'de 90 s olarak programlanmıştır. PCR reaksiyonu 35 döngü ve final uzaması 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.3. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR ürünleri jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Bu amaçla 1,0 g agaroz tartılarak 100 ml 1X TAE tamponu içerisinde çözülerek hazırlanan karışım mikrodalga fırında tamamen homojen hale gelinceye kadar kaynatılmış ve ardından sıcaklık yaklaşık 50°C'ye gelinceye kadar bekletilerek içerisine konsantrasyonu 0,5 µg/ml olan etidyum bromürden 3,5 µl eklenmiştir. %1'lik hazırlanan jel karışımı, dengelenerek tarakları takılmış olan jel kasetinin içerisine dökülmüş ve agarozun polimerleşmesi için yaklaşık 30 dk bekletilmiştir. 30 dk sonunda taraklar dikkatli bir şekilde çıkarılmış ve çıkarılan jel, 1X TAE tamponu ile dolu olan elektroforez tankına alınmıştır. İlk kuyuya 1 kb DNA markırı (HyperLadder 1kb, 200, 400, 600, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10037 bp), diğer kuyulara ise örnekler (5 µl) 2,0 µl 6X yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklenmiştir. Jel sistemi güç kaynağına bağlanarak 90 voltta 50 dk yürütülmüş ve DNA bantları, jel görüntüleme sistemi yardımıyla görüntülenmiştir (Görmez 2011).

3.2.4.4. 16S rRNA PCR Ürünlerinin Klonlanması

Kompetent Hücre Hazırlanması

Bu çalışmada, kompetent hücre yapımında *E. coli* JM101 suşu kullanılmıştır. *E. coli* JM101 suşu stoktan alınarak LBA'da canlandırılmış ve canlanan hücrelerden öze yardımıyla tek koloni alınarak LB Broth'a ekim yapıp, bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kültürler 1/10 oranında seyreltilerek, spektrofotometrede OD600 nm'de ölçüm alınmıştır. 30 ml LB Broth üzerine, OD600: 0.1 olacak şekilde ön kültür eklenmiş ve 37°C'de 60-90 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon boyunca her 20 dk'da OD600: 0.44-0.55 aralığına gelinceye kadar ölçüm alınmıştır. Uygun değeri veren kültür, +4°C'de 4500 rpm'de 10 dk çöktürülmüştür. Bu aşamadan sonra tüm işlemler soğuk zincir bozulmadan ve oldukça nazik bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak, pellet üzerine 10 ml CaCl₂ eklenmiş ve hafifçe vurularak hücreler çözündürülmüştür. 30 dk boyunca buz üzerinde bekletilen hücreler +4°C'de 10 dk, 4500 rpm'de tekrar santrifüj edilerek süpernatant kısmı uzaklaştırılmıştır. Pellet üzerine yeniden 2 ml CaCl₂ eklenerek çözündürülmüş ve örnekler 1 gece (12 saat) buzdolabında (+4°C) bekletilmiştir (Tarakçıoğlu 2016). Hazırlanan kompetent hücrelerin kullanılabilme süresi 2 gündür.

Ligasyon İşlemi

5 µl 2X ligasyon bufferı, 3 µl PCR ürünü, 1 µl pGEM®-T Easy (1:1 oranında sulandırılmış vektör) ve 1 µl T4 DNA ligaz olacak şekilde 10 µl'lik reaksiyon karışımı hazırlanarak hazırlanan karışım PCR tüplerine dağıtılmış ve 16°C'de 1 gece (yaklaşık 14 saat) PCR cihazında bekletilmiştir (Tarakçıoğlu 2016).

Transformasyon

Transformasyon için Amfisilinli LB Agar kullanılmıştır. Hazırlanan kompetent hücrelerden her bir eppendorf tüp içerisine 200 µl koyularak üzerine 2 µl ligasyon ürünü eklenmiş ve 30 dk boyunca buz üzerinde inkübasyona bırakılmıştır. Ardından hücreler, 42°C'lik su banyosunda 2 dk bekletildikten sonra, tekrar buz üzerine alınarak yaklaşık 5

dk beklenilmiştir. Her bir tüp içerisine, steril kabin ortamında 200 µl LB Broth eklenmiş ve 37°C’de 2 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda dipteki hücrelerden, 50 µl alınarak, 40 µl X-gal ile 7 µl IPTG eklenerek önceden hazırlamış olduğumuz “Amfisilinli LB Agar” üzerine ekim yapılmıştır. Petriler 37°C’de 12-14 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ligasyon ürünü olmayan kompetent hücre, “Amfisilinli LB Agar” a ekilmiş ve negatif kontrol olarak kullanılmıştır (Sarı 2016).

Koloni Seçimi ve Koloni PCR

Transformasyondan sonra 12-16 saatlik inkübasyonun sonunda oluşan mavi-beyaz kolonilerden beyaz kolonilerin daha sağlıklı olarak seçilebilmesi için, hazırlanan örnekler, + 4°C’de 4-5 saat bekletilmiştir. Seçilen beyaz kolonilerden koloni PCR işlemi yapılmıştır. 16,1 µl dH₂O, 3 µl 10X PCR buffer, 0,6 µl dNTP, 1,8 µl MgCl₂, 1,5 µl T7 primeri (5’-AA TAC GAC TCA CTA TAG-3’), 1,5 µl SP6 primeri (5’-AT TTA GGT GAC ACT ATA G-3’), 1,2 µl DMSO ve 0,3 µl Taq DNA polimeraz karışımından oluşan 26 µl PCR master miksi içerisine seçilen koloniler inokule edilmiştir. Hazırlanan tüpler PCR cihazına yerleştirilerek, reaksiyon koşulları, 95°C’de 10 dk, 94°C’de 30 s, 45°C’de 30 s, 72°C’de 120 s 35 döngü ve final uzaması 72°C’de 10 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir (Baltacı 2015). PCR reaksiyonu sonucunda, örnekleri görüntülemek için %1’lik agaroz jel hazırlanmıştır. 90 voltta 50 dk yürütülen ve transforme edilen geni taşıyan örneklerden en net görüntü verenler seçilerek plazmid izolasyonu için, amfisilin içeren LB Broth besiyerine inoküle edilmiştir.

Plazmid İzolasyonu

Plazmid izolasyonu için, seçilen kolonilerden 3 ml amfisilinli LB Broth içerisine ekim yapılmıştır. Bu kültürler 37°C’de bir gece boyunca (16 saat) 150 rpm’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda plazmid izolasyonu için, “Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit” kullanılmıştır.

3.2.4.5. 16S rRNA Gen Bölgeleri Sekans Analizi

16S rRNA gen bölgelerinin baz dizilimi analizleri hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Plazmid örneklerinden 50 µl alınarak, Oligomer (Türkiye) firmasına gönderilmiş ve alınan sekans sonuçları BioEdit programı aracılığı ile analiz edilmiştir. Sekans dizileri ilk olarak Fasta formatına çevrilmiş ve vektöre ait diziler sekanstan çıkarılarak dizi anlamlı hale getirilmiştir. Son olarak BLAST analizi yapılarak, Gen Bankasındaki dizilerle kıyaslanma yapılmış ve izole edilen bakterilerin tür seviyesinde analizi gerçekleştirilmiştir. Tanılaması yapılan bakteriler Genbank numaraları alınarak NCBI veri tabanına eklenmiştir (Adıgüzel vd. 2015).

3.3. Bakterilerden Pigment İzolasyonu

NA besi ortamında yaklaşık 2 gün geliştirilen bakteri kültürleri NB besi ortamına alınarak oda sıcaklığında 150 rpm'de 5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda 9000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra süpernatantı atılarak alınan pellet, metanol ile süspanse edilmiştir. Süspanse edilen karışım 9000 rpm'de 15 dk santrifüj edildikten sonra pigmentin toplandığı süpernatant kısmı steril kurutma kağıdı kullanılarak süzülmüştür. Evaporatör cihazı ile metanolu uçurularak konsantrasyonu artırılmış pigmentler petrilere dökülerek 60°C'de kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan pigmentler gram cinsinden tartılmış ve sonraki uygulamalar için + 4°C'de saklanmıştır (Shetti 2017).

3.3.1. Pigmentlerin Karakterizasyonu

İzole edilen pigmentlerin karakterizasyonu için TLC metodu ve UV absorbans spektrofotometresi kullanılmıştır.

3.3.1.1. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İzole edilen pigmentlerin kromatografik olarak analizinde; kırmızı pigmentler için çözücü olarak etil asetat, hareketli faz olarak kloroform/metanol (9/1 oranında) (Faraag et al. 2017); turuncu ve sarı pigmentler için çözücü olarak metanol, hareketli faz

olarak ise metanol/aseton (30/20 oranında) tercih edilmiştir (Nakul and Gupta 2018). TLC silika tabakaları uygun boyutta kesildikten sonra, uygun çözücüler içerisinde çözdürülen pigmentlerden 10-20 µl alınarak silika tabakaya yüklenmiştir. Beher içerisine çözücüler konulmuş ve silika tabaka üzerine dik olarak yerleştirilerek ağzı folyoyla kapatılmıştır. Ortalama 5-10 dk. sonra pigment içerisindeki bileşenler ayrıştırılmış ve görüntü UV altında değerlendirilerek R_f değerleri hesaplanmıştır. R_f değerinin hesaplanmasında aşağıda verilen formül kullanılmıştır (3.1).

$$R_f = \frac{\text{bileşimin yükleme noktasından itibaren yürüdüğü yol}}{\text{çözücünün orjin noktasından itibaren yürüdüğü yol}} \quad (3.1)$$

3.3.1.2. Spektrofotometrik Ölçümler

İzole edilen pigmentler metanol ile çözdürüldükten sonra, quartz küvetler kullanılarak kırmızı pigmentliler için 300-700 nm (Ahmad *et al.* 2012), turuncu ve sarı olanlar için ise 350-550 nm dalga boyunda ölçümler alınmıştır (Nakul and Gupta 2018). Ölçüm sonucunda çıkan pikler doğrultusunda değerlendirmeler yapılmıştır.

3.3.2. Pigmentlerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

3.3.2.1. Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti

İzole edilen pigmentlerin antibakteriyel aktivitesi olup olmadığını belirlemek amacıyla agar difüzyon testi kullanılmıştır. Pigmentlerin antibakteriyel etkinliği *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, Metisilin dayanıklı *S. aureus* (MRSA)'a karşı test edilmiştir. Bu amaçla uygulanan agar difüzyon testinde, soft MHB besiyeri ile dökme plak yöntemi yapılmıştır. Hazırlanan petripler içinde, 6 mm mantar delici ile kuyular açılarak, pigmentler eklenmiştir. Petripler düz pozisyonda 30°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmış ve inkübasyon sonunda inhibisyon zon oluşumu gözlenerek ölçümler alınmıştır (Wiegand *et al.* 2008).

3.3.2.2 Hemoliz Aktivitesinin Tespiti

İzole edilen pigmentlerin kanda bulunan eritrosit hücreleri üzerine olan etkisini gözlemek amacıyla uygulanan yöntemde ticari olarak alınan kan örneği kullanılmıştır. Kan örneğinden 4 ml alınıp D-PBS (Dulbecos phosphate-buffered saline) eklenmiştir. Serumdan kırmızı kan hücreleri ayrılmak istenmiş ve 10020 g'de 5 dk santrifüj yapılarak çöktürme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin ardından 5 kez D-PBS ile santrifüj edilerek yıkama işlemi yapılmış ve ardından 40 ml D-PBS ile kırmızı kan hücreleri dilüe edilmiştir. Dilüe edilen kan hücrelerinden 200 µl alınıp üzerine 800 µl konsantrasyonları belirlenen pigment örneklerinden eklenerek kısa süre vortekslenen örnekler oda sıcaklığında 4 saat statik konumda bekletilmiştir. Her örnek için 3 tekrar çalışılmış ve çalışmada pozitif kontrol olarak dH₂O, negatif kontrol olarak D-PBS kullanılmıştır. Sonuçlar hemoglobinin max absorbans gösterdiği 577 nm'de ölçüm alınarak değerlendirilmiştir (Yu *et al.* 2011).

3.3.2.3. Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Tespiti

İzole edilen pigmentlerin sağlıklı insan dermal fibroblast (ATCC® PCS-201-012™) hücre hattına olan etkisini ve toksisitesini incelemek amacıyla MTT (3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid) analizi yapılmıştır. MTT analizi için fibroblast hücreleri 96 kuyucuklu plakelere ekilmiştir. İzole edilen pigmentler 100 µl olacak şekilde hücrelere verilerek 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 0,5 mg MTT boyası 1 ml steril PBS ile hazırlanarak filtreden geçirilmiştir. Her kuyucuğa 20 µl olacak şekilde MTT boyası eklenmiş ve 37°C'de 3 saatlik inkübasyon sonunda plate 10 dk 1800 rpm'de santrifüj edilmiştir. Supernatantı uzaklaştırılan hücrelere 150 µl DMSO eklenerek 5-10 dk çalkalayıcıda bekletilmiş ve spektrometrede 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri elde edilmiştir. Uygulanan pigmentler ve konsantrasyonları için yüzde canlılık ve sitotoksite değerleri hesaplanarak sonuçlar değerlendirilmiştir (Meerlo *et al.* 2011).

3.3.3. İzole Edilen Pigmentlerin Kumaş Boyası Olarak Uygulanması

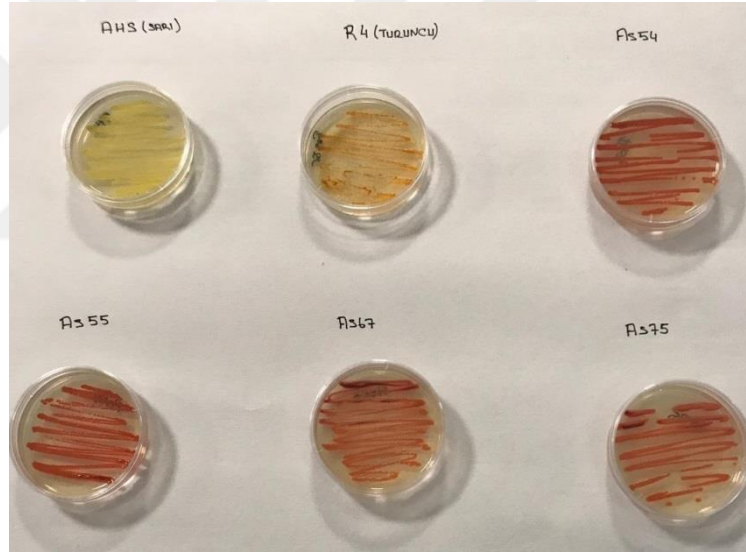
İzole edilen pigmentlerin konsantrasyonları tespit edildikten sonra herbiri aynı konsantrasyonda olacak şekilde 12 ml saf suda çözdürülerek boya solüsyonları hazırlanmıştır. Elde edilen boya solüsyonlarının içine 2 gr ipek kumaş ve kumaşın ağırlığının 1/100'ü kadar olacak şekilde NaCl eklenerek 10 dk. ısıtıcıda kaynatılmıştır. Solüsyon tamamen berraklaştıktan sonra ipek kumaş çıkarılmış ve kurumaya bırakılmıştır.



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

4.1. Pigment Üreten Bakterilerin Seçimi

Araştırma kapsamında önceki çalışmalarda izole edilen ve kültür koleksiyonunda bulunan yaklaşık 570 izolattan 13 farklı renk üreten bakteri tespit edilerek bunlardan yoğun renk oluşturan 6 bakteri ile çalışmalar devam ettirilmiştir. Bu bakteriyel izolatlardan AS-54, AS-55, AS-67 ve AS-75 kodlu izolatların Erzurum ilinde Akdağ bölgesinde farklı lokasyonlardaki çamurlu toprak örneklerinden, AHS ve FAS-TUR kodlu diğer iki izolatın ise Erzurum ili Yakutiye ilçesinde çeşitli bitkilerin (kazayağı otu ve fasulye) rizosfer bölgesinden izole edildiği ve inkübasyon sıcaklıklarının ortalama 28°C olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.1 İzole edilen bakterilerin besi ortamındaki görüntüleri

4.2. Bakteri İzolatlarının Morfolojik Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının morfolojik özelliklerini belirlemede hücre boyama, hareketlilik ve Gram boyama testleri yanında koloni renkleri de tespit edilmiştir. Yapılan testler sonucunda izolatların morfolojik olarak tamamının çubuk şeklinde olduğu, Gram boyama testlerinde ise AHS kodlu izolatın Gram (+), diğerlerinin ise Gram (-) olduğu belirlenmiştir. Hareketlilik testleri sonucunda AS-54, AS-55, AS-67,

AS-75 hareketli, AHS ve FAS-TUR kodlu izolatların ise hareketsiz olduğu tespit edilmiştir. Aynı zamanda bakteriyel izolatlardan AS-54, AS-55, AS-67 ve AS-75 kodlu izolatların kırmızı, AHS kodlu izolatın besi ortamında sarı, FAS-TUR kodlu izolatın ise turuncu renkli koloni oluşturdukları gözlenmiştir (Çizelge 4.1).

4.3. Bakteri İzolatlarının Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Bakteri izolatlarının biyokimyasal özelliklerini belirlemek için katalaz ve oksidaz testleri yapılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1’de verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde katalaz testi için; FAS-TUR kodlu izolatın katalaz (-), diğer tüm izolatların ise katalaz (+) olduğu, oksidaz testi için ise tamamının oksidaz (-) olduğu tespit edilmiştir. İzolatların biyokimyasal test sonuçlarının tür tanıları ve literatür verileriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir (Hejazi *et al* 1997, Srimathi *et al.* 2017).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

Çizelge 4.1 İzolatların morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

İzolasyon kodu	Morfolojik Testler				Biyokimyasal Testler	
	Hücre Morfolojisi	Hareketlilik Testi	Gram Testi	Koloni rengi	Katalaz	Oksidaz
AHS	Kok	-	+	Sarı	+	-
FAS-TUR	Kok	-	-	Turuncu	-	-
AS-54	Çubuk	+	-	Kırmızı	+	-
AS-55	Çubuk	+	-	Kırmızı	+	-
AS-67	Çubuk	+	-	Kırmızı	+	-
AS-75	Çubuk	+	-	Kırmızı	+	-

4.4. Bakteri İzolatlarının Moleküler Tanılanması

4.4.1. Bakteri İzolatlarından Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmada pigment ürettiği tespit edilen bakterilerden DNA izolasyonları ticari kit kullanılarak gerçekleştirilmiş ve izole edilen DNA'ların konsantrasyonları (83,75-230,2 ng/µl) aralığında ölçülerek agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. İzole edilen DNA örnekleri sonraki aşamalarda kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

4.4.2. Bakterilerin 16S rRNA Gen Bölgelerinin PCR ile Çoğaltılması ve Jel Elektroforezi

Pigment üreten bakterilerin DNA'ları izole edildikten sonra 16S rRNA gen bölgesi PCR ile çoğaltılmıştır. Çoğaltılan PCR ürünleri %1'lik agaroz jelde yürütülmüş ve yaklaşık 1500 bp uzunluğunda oluşan bantların görünütüsü DNA görüntüleme sistemi ile tespit edilmiştir.

4.4.3. 16S PCR Ürünlerinin Kompetent *E. coli* Hücrelerine Klonlanması

Bakterilerin tanılanması sırasında PCR ile amplifikasyonu sağlanan gen bölgesinden kayıplar olmaması amacıyla ligasyon işlemi ile klonlama vektörünün içine sokulmuştur. Daha sonra ligasyon ürünleri *E. coli* JM101 içerisine transforme edilmiş ve transformasyon işlemi sonucunda oluşan mavi beyaz kolonilerden, beyaz koloniler seçilerek 16S rRNA gen bölgesini taşıyıp taşımadığı konusunda test edilmiştir.

Vektörde bulunan çoklu klonlama bölgesinde laktozu parçalayan *Lac Z* geni bulunmakta ve aktarmak istediğimiz gen bu bölge içerisine insört edilmektedir. Klonlama eğer başarılı olmamışsa gen aktif halde olduğundan ortamdaki laktozu parçalayarak mavi koloni oluşturmaktadır. Klonlamanın başarılı olması durumunda ise β-galaktosidaz gen bölgesi bütünlüğü bozulmakta ve yerine aktarılan gen geçmektedir. Bunun sonucunda ise besi yerinde bulunan laktoz parçalanamamakta ve beyaz koloniler oluşmaktadır. Klonlama sırasında IPTG β-galaktosidaz geni için bir uyarıcı, kromojen bir madde olan X-Gal ise laktoz analogu olarak kullanılmıştır. Dolayısıyla X-Gal, β-

galaktosidaz geni aktif olduğu zaman parçalanarak mavi renkte koloniler oluşturacak, klonlamanın başarılı olduğu durumda ise X-Gal parçalanmadığından beyaz kolonilerin oluşumu gözlenecektir. Bu amaçla kontrol amaçlı ligasyon ürünü içermeyen kompotent hücrelerinde eklendiği besi ortamında herhangi bir gelişme olmazken transformant hücrelerin olduğu koloniler beyaz, diğerleri mavi olarak görüntülenmiştir.

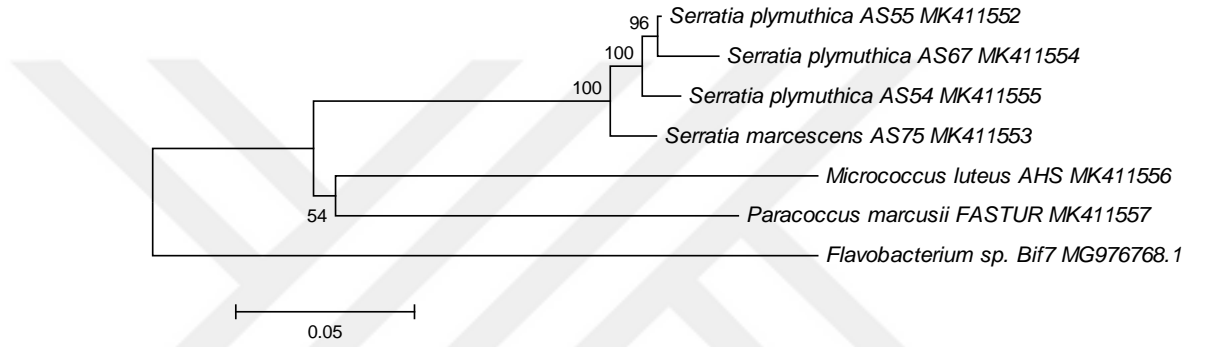
Bu bağlamda her petri için 3 beyaz koloni belirlenerek koloni PCR yöntemiyle doğrulama işlemi yapılmıştır. Her petri için, DNA markırında yaklaşık 1500 bp hizasında bant veren en parlak koloni seçilmiş ve antibiyotikli besiyerine aktarılarak plazmid izolasyonu aşamasına geçilmiştir. Plazmid DNA Ekstraksiyon Kiti kullanılarak gerçekleştirilen izolasyon akabinde elde edilen plazmidler, agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. Plazmidlerin absorbans ölçümleri alındıktan sonra da sekans analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.4.4. 16S rRNA Gen Bölgeleri Sekans Analizi Sonuçları

Karşılaştırmalı DNA dizi analizi yöntemi mikrobiyal tanılamada en iyi genotipik yöntemlerden birisidir. En yaygın olan yaklaşım ise, izolatların 16S rRNA gen bölgesinin kullanımıyla tanılanmasıdır. Bu amaçla çalışmada amplifiye edilerek klonlanan ve akabinde koloni PCR ile seçilerek izole edilen ve saflaştırılan plazmidlerin sekans analizi gerçekleştirilmiştir. 16S rRNA gen bölgesine ait sekans analizleri BioEdit programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Dizilerin fasta formatından vektöre ve primerlere ait olan sekansları çıkarılarak dizi anlamlı hale getirilmiştir. Elde edilen dizi, Gen Bankasındaki dizi analizleriyle karşılaştırılmış ve filogenetik ağaçları çıkarılmıştır (Şekil 4.2). Bakteriyel izolatların tür seviyesinde tanınması yapılmış ve GenBank numaraları alınmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 Bakteriyel izolatların tanı sonuçları

İzolat Kodu	Tanı Sonucu	Genbank Numarası	Benzerlik Yüzdesi	Baz Uzunluğu
AHS	<i>M. luteus</i>	MK411556	%98	1432 (bç)
FAS-TUR	<i>P. marcusii</i>	MK411557	%98	1353 (bç)
AS-54	<i>S. plymuthica</i>	MK411555	%97	1517 (bç)
AS-55	<i>S. plymuthica</i>	MK411552	%98	1449 (bç)
AS-67	<i>S. plymuthica</i>	MK411554	%97	1511 (bç)
AS-75	<i>S. marcescens</i>	MK411553	%99	1439 (bç)

**Şekil 4.2** Bakteriyel izolatların filogenetik ağacı

16S rRNA gen bölgelerinin, Neighbour-Joining yöntemi ile filogenetik ağacı gösterilmiştir (Saitou and Nei 1987). MEGA-6 programı kullanılarak çizilmiş olan filogenetik ağaç 7 farklı organizmanın nükleotid dizisini kapsamaktadır. *Flavobacterium sp.* (MG976768) uygun dış grup olarak belirlendiği filogenetik analizde bootstrap değeri 1000 tekrarlı olarak seçilmiştir.

Filogenetik ağaç incelendiğinde Gram negatif bakteriler içerisinde *Serratia* cinsine ait türlerin bir arada olduğu ancak, *P. marcusii* türünün ise Gram pozitif bir bakteri olan *M. luteus* ile daha yakın bir grupta yer aldığı gözlenmiştir. *S. marcescens* ile *S. plymuthica*'nın birbirinden %4 oranında farklılık gösterdiği bu iki türün de diğer türler ile ortalama % 54 oranında benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. Dış grup olarak seçilen ve pigment üretimi gözlenen *Flavobacterium sp.*'nin ise her iki grupta da ilişkili olduğu gözlemlenmiştir.

4.5. Pigment İzolasyonu

Pigment üreten bakterilerden 5 günlük inkübasyon sonucunda metanol kullanılarak pigment izolasyonu yapılmıştır. Pigment izolasyonunda kullanılan metanol evaporatörde uçurularak pigmentler konsantre hale getirilmiştir (Şekil 4.3). Petrilere alınan pigmentler 60°C’de kurumaya bırakılmış ve kuruyan pigmentler gram cinsinden tartılarak (Çizelge 4.3) sonraki uygulamalar için +4°C’de saklanmıştır (Şekil 4.4). Pigmentlerin izolasyonunda kullanılan bu yöntem pek çok araştırmacı tarafından da kullanılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (Shetti *et al.* 2017).

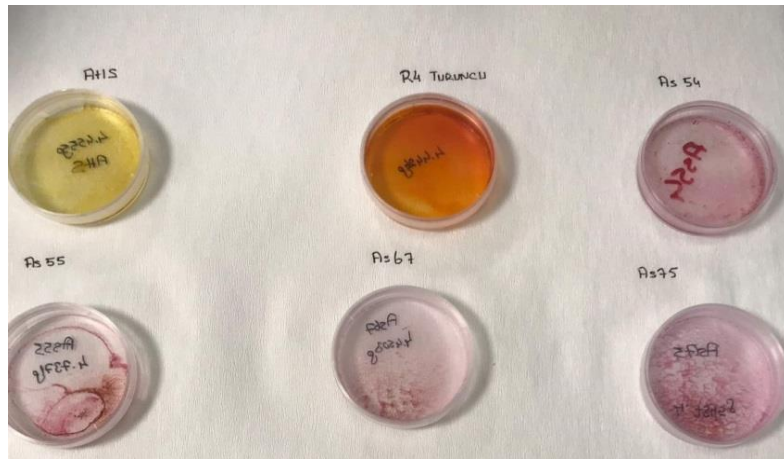
Pigment ekstraksiyonunun yapıldığı çalışmalarda pek çok araştırmacı tarafından farklı çözücüler kullanmıştır. Goswami and Bhowal (2014) çalışmasında çözücü olarak HCl içeren etanolu, Srimathi *et al.* (2017) çözücü olarak aseton ve etil asetatı, Nakul and Gupta (2017) ile Chandra *et al.* (2018) çalışmalarında çözücü olarak metanolu Numan *et al.* (2018) ve Tandale *et al.* (2018) ise çalışmalarında çözücü olarak sadece etil asetatı kullanmışlardır. Shahitha *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada ise çözücü olarak aseton kullanılmış ancak bu araştırmacılar pigment ekstraksiyonu yapmadan kültür ortamına asetonu ekleyerek inkübasyon sonucunda yeniden bu çözücüyü kullanarak ekstraksiyonu gerçekleştirmişlerdir. Literatürde pek çok çözücü kullanılsa da en çok tercih edilenlerin etil asetat ve metanol olduğu gözlenmiş ve çalışmamızda çözücü özelliğinin iyi olması nedeniyle metanol tercih edilmiştir. İzolasyon sonucunda elde edilen pigmentlerin kuru ağırlıkları değerlendirildiğinde literatürde farklı araştırmacılar tarafından farklı miktarlarda pigment miktarı saptandığı görülmüştür. Shahitha and Poornima (2012), NB besi ortamında üretmiş oldukları pigmentin 0,51 g, Nakul and Gupta (2017) 0,07 g ve 0,10g, Srimathi *et al.* (2017) ise çalışmalarında elde ettikleri pigmentlerin kuru ağırlıklarını 3,4 g/L ve 0,031g/L olarak saptamışlardır. Literatürle karşılaştırıldığında Çizelge 4.3’de yer alan pigment kuru ağırlıklarının diğer çalışmalara nazaran farklı olduğunu söylemek mümkündür. Bunun en büyük nedeni pigmentlerdeki kuru ağırlık miktarlarının literatürde genellikle g/L üzerinden verilmişken çalışmada verilen kuru ağırlık miktarlarının 200 ml’de g cinsinden olmasıdır. Bunun yanında kullanılan çözücü ve inkübasyon parametrelerine bağlı olarak da pigment üretimi ve miktarları farklılık gösterebilmektedir. Renklendirme amacıyla kullanılan boyar madde miktarının elde edilen rengin tonuna ve

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

dayanıklılığına etkisi olduğu bilindiğinden kullanılan pigmentin kuru ağırlılığının tespit edilmesi önemlidir. Örneğin kırmızı bir pigment kullanılırken kullanılan pigmentin miktarına bağlı olarak pembeden kırmızıya farklı renk skalası ortaya çıkabilmektedir. Bu nedenle çalışmada miktar tayini yapmak büyük önem arz etmektedir.



Şekil 4.3 Evaporatör ile metanolun pigmentten uzaklaştırılması



Şekil 4.4 Kurutulmuş pigmentler

Çizelge 4.3 İzole edilen pigment miktarları

Bakteri İzolatları	Pigment Miktarları
AHS	0,2593 g
FAS-TUR	0,0724 g
AS54	0,374 g
AS55	0,0366 g
AS67	0,062 g
AS75	0,0375 g

4.5.1. Pigmentlerin Karakterizasyonu

İzole edilen pigmentlerin karakterizasyonu için uygulanan TLC metoduna göre; sarı pigmentli AHS ile turuncu pigmentli FASTUR izolatları için R_f değeri (4.1);

$$\frac{5,5}{6} = 0,9 \text{ cm olarak,} \quad (4.1)$$

kırmızı pigmentli AS-54, AS-55, AS-67, AS-75 izolatları için ise R_f değeri (4.2);

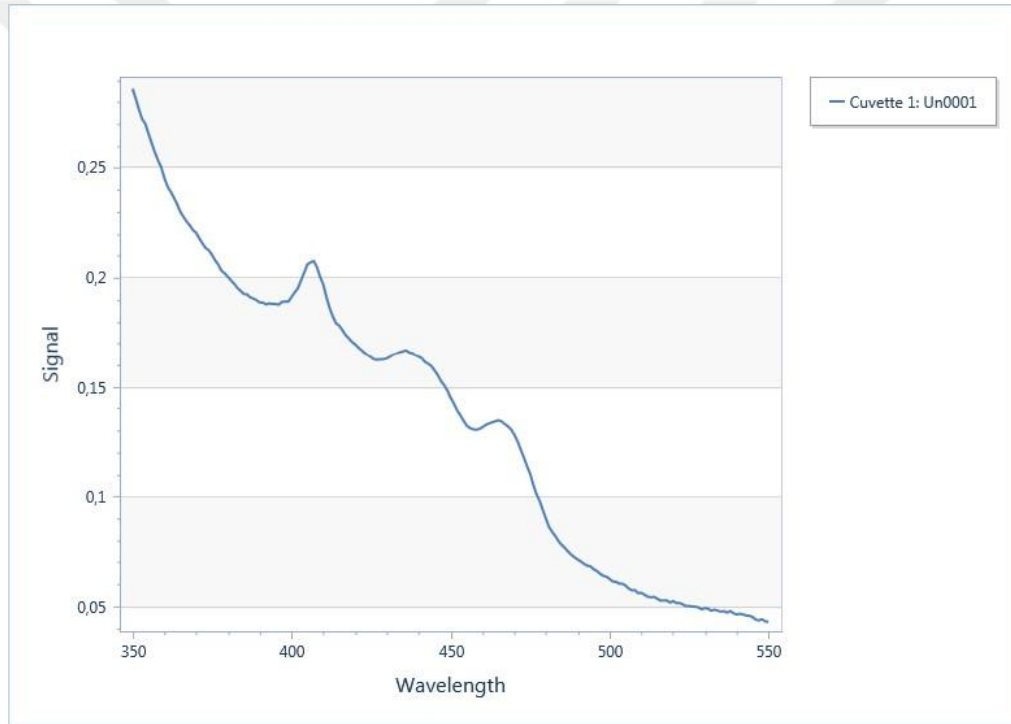
$$\frac{3,5}{5} = 0,7 \text{ cm olarak bulunmuştur.} \quad (4.2)$$

R_f değerleri incelendiğinde alınan sonuçların; literatürdeki çalışmalarla karşılaştırıldığında AHS ve FAS-TUR izolatlarının Indra *et al.* (2014) ve Nakul and Gupta (2017)'nin yaptığı çalışmalarda ki beta-karotenler ile, kırmızı pigmentli AS-54, AS-55, AS-67 ve AS-75 izolatlarının ise Faraag *et al.* (2017) ve Srimathi *et al.* (2017) tarafından yapılan çalışmalarda ki prodigiosinin ile benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir.

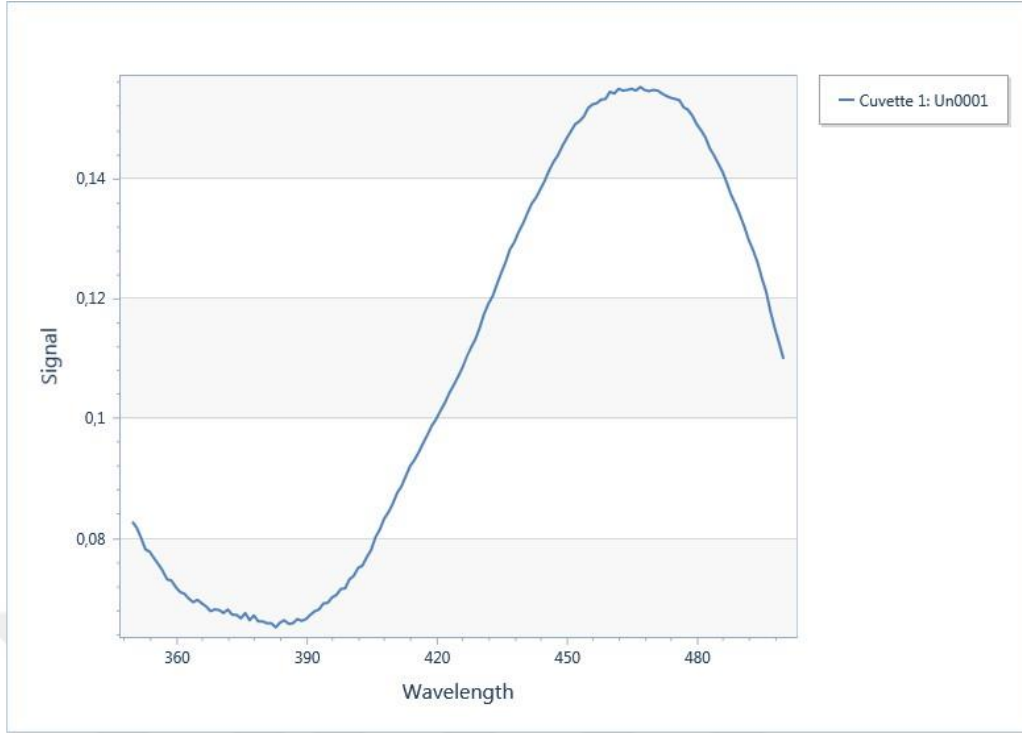
Spektrofotometrik ölçümlerine göre; AHS ve FAS-TUR izolatlarından elde edilen sarı ve turuncu renkli pigmentler metanolde çözdürülerek 350 ile 550 nm dalga boyu aralığında ölçülmüş ve yapılan ölçümler sonucunda 400-450 nm aralığında pikler verdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5, 4.6). Alınan ölçüm değerlerinin literatür verileriyle

4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

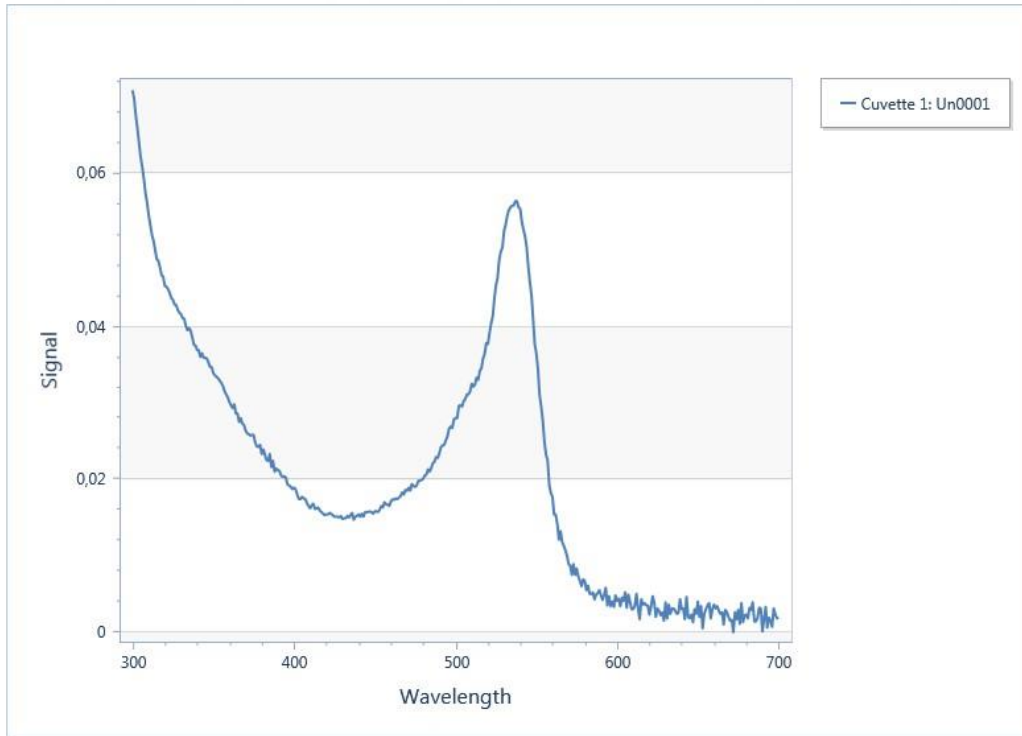
karşılaştırılması sonucunda her iki pigmentin de beta-karoten olduğu tespit edilmiştir (Ahmad *et al.* 2012, İndra *et al.* 2014, Nakul and Gupta 2017). Yine AS-54, AS-55, AS-67 ve AS-75 izolatlarından elde edilen kırmızı renkli pigmentler de metanolde çözdürülerek 300 ile 700 nm dalga boyu aralığında ölçümler alınmış ve yapılan ölçümler sonucunda 535 ile 540 nm aralığında değişen değerlerde pikler gözlenmiştir (AS-54 izolatu 536nm (Şekil 4.7), As-55 izolatu 537 nm (Şekil 4.8), AS-67 izolatu 537 nm (Şekil 4.9), AS-75 izolatu 537 nm (Şekil 4.10). Literatür verileriyle karşılaştırıldığında bu izolatlardan elde edilen pigmentlerin de prodigiosin veya onun türevleri olabileceği tespit edilmiştir (Ahmad *et al.* 2012, Faraag *et al.* 2017, Srimathi *et al.* 2017).



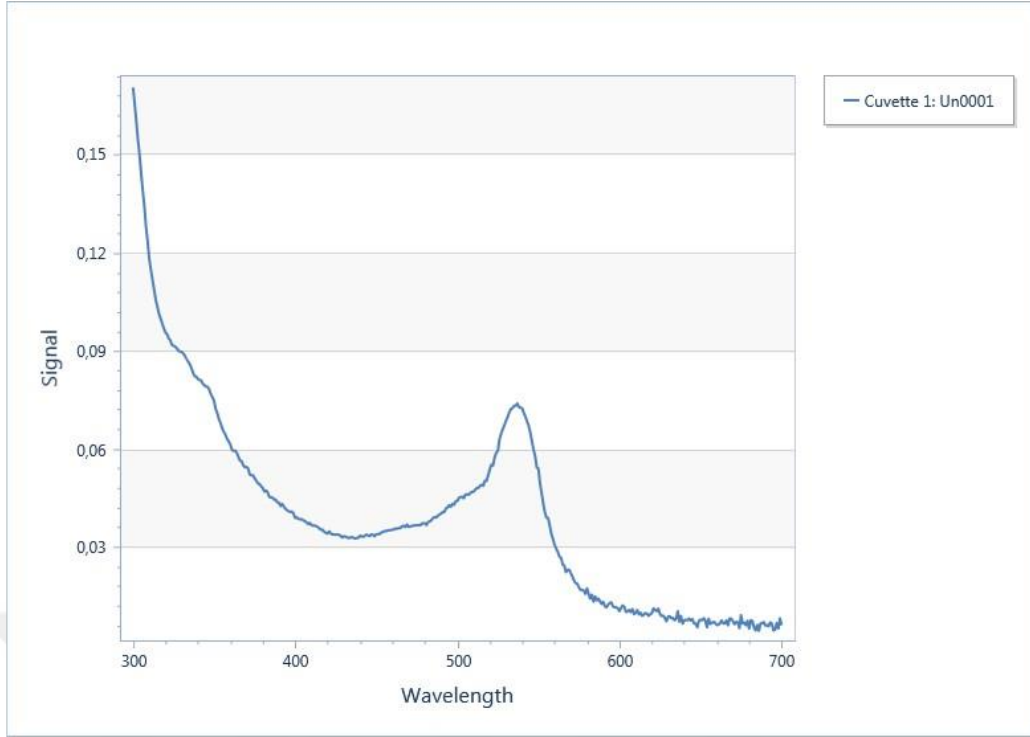
Şekil 4.5 AHS pigmentinin 400-410 nm’de maksimum verdiği ışımaya



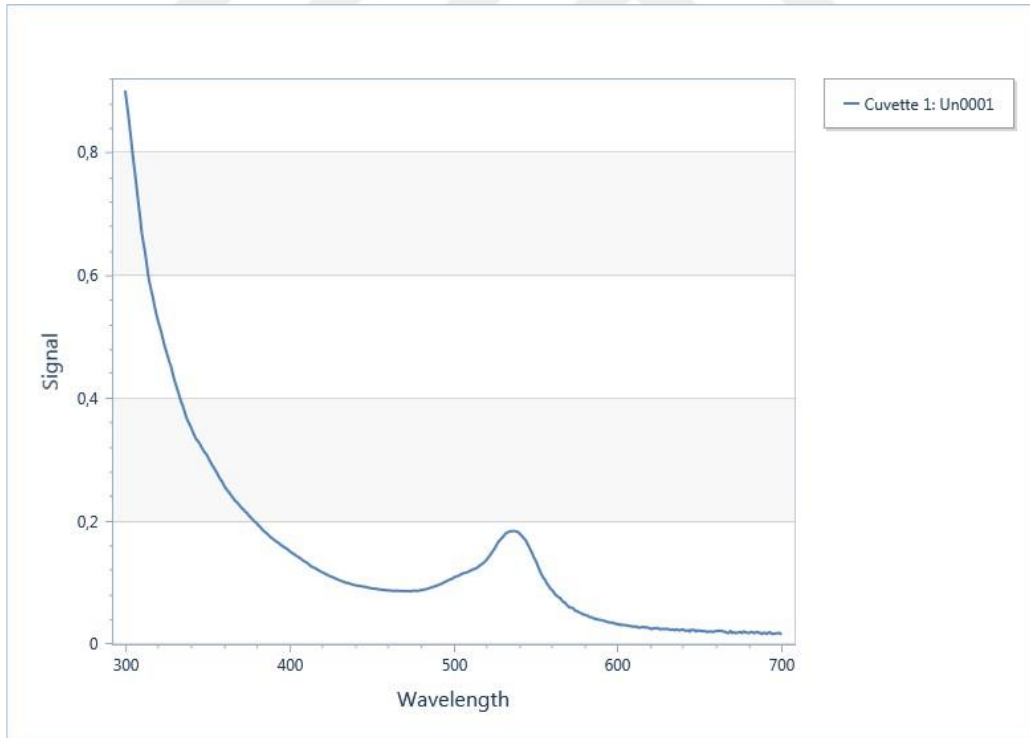
Şekil 4.6 FAS-TUR pigmentinin 450-460 nm’de verdiği maksimum ışımaya



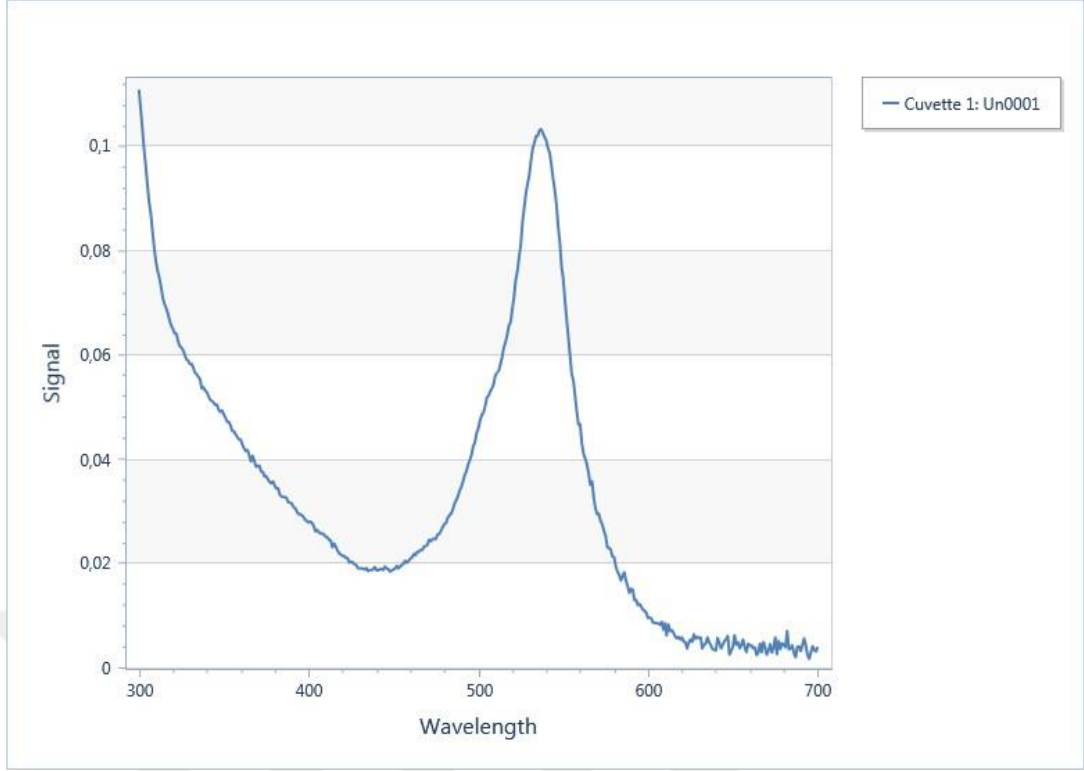
Şekil 4.7 AS-54 pigmentinin 536 nm’de verdiği maksimum ışımaya



Şekil 4.8 AS-55 pigmentinin 537 nm’de verdiği maksimum ışımaya



Şekil 4.9 AS-67 pigmentinin 537 nm’de verdiği maksimum ışımaya



Şekil 4.10 AS-75 pigmentinin 537 nm’de verdiği maksimum ışımaya

4.5.2. Pigmentlerin Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi

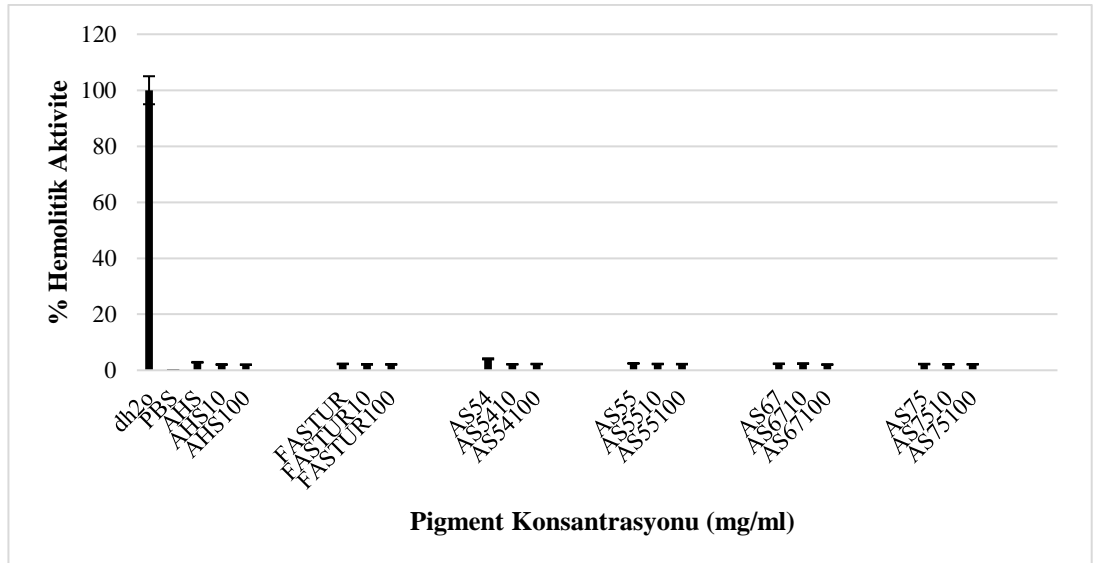
4.5.2.1. Antibakteriyel Aktivitesinin Tespiti

İzole edilen pigmentlerin antibakteriyel aktivitesinin tespiti amacıyla uygulanan agar difüzyon testi sonuçlarına göre; test edilen bakteri izolatlarına (*E.coli*, *S. aureus*, Metisilin dayanıklı *S. aureus* (MRSA), *P. aeruginosa*) karşı zon oluşumu gözlemlenmemiştir. Literatürde betakaroten ve prodogiosinin pek çok bakteriye karşı antibakteriyel özelliğinin olduğu tespit edilmiştir (Wiegand, Hilpert *et al.* 2008). Ancak çalışmamızda antibakteriyel aktivitenin test edildiği izolatların nozokomiyel enfeksiyonlara neden olan oldukça dirençli organizmalar olması nedeniyle verilerimizin bazı literatürlerle uyuşmadığı gözlenmiştir. Lapenda *et al.* (2015) tarafından yapılan bir çalışmada *S. marcescens*’den izole edilen prodogiosin pigmentinin antimikrobiyal etkisi *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. pyogenes*, *Acinetobacter sp.* ve oksasilin dirençli *S. aureus* (ORSA)’a karşı test edilmiş ve test edilen pigmentin *E. coli*, *Acinetobacter spp.* ve *P. aeroginasa*’ya karşı etkisiz olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmanın

sonuçları ile karşılaştırıldığında tez çalışmasında test edilen patojenlerin de diğer çalışmada kullanılan izolatlar ile benzer olduğu ve bu durumun da bu organizmalara karşı prodigiosinin etkili olmadığını düşündürmektedir. Yapılan çalışmada aynı zamanda oksasilin dirençli 20 *S. Aureus*(ORSA) izolatına karşı pigmentin bakterisidal ve bakteriyostatik etki gösterdiği ve ORSA'ya yönelik antibiyotik terapilerinde uygulanabilirliği önerilmiştir. Bu nedenlerle pigmentin farklı bakteri türlerine karşı farklı aktiviteye sahip olduğu söylenebilmektedir. Bakterilerden izole edilen beta-karoten pigmenti için de literatürdeki çalışmalar incelenmiş Ahmad *et al.* (2012) tarafından yapılan çalışmada pigmentin antimikrobiyal etkisi *E. coli* ve *B. cereus*'a karşı test edilmiş ve çalışmanın sonucunda antimikrobiyal etkisinin çok fazla olmadığı gözlemlenmiştir. Bu çalışmanın da AHS ve FAS-TUR izolatlarından elde edilen ve beta karoten olduğu düşünülen pigmentle ilgili test sonuçlarını desteklediği görülmüştür.

4.5.2.2. Hemoliz Aktivitesinin Tespiti

Hemolitik aktivite testleri ticari olarak satın alınan kan örneği ile gerçekleştirilmiş ve pozitif kontrol olarak dH₂O, negatif kontrol olarak PBS kullanılmıştır. İzole edilen pigmentlerin hemolitik aktivitelerine ait grafik Şekil 4.11'de verilmiştir.

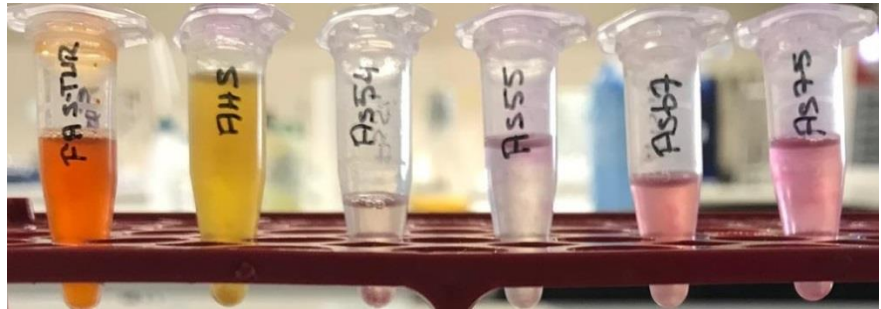


Şekil 4.11 İzole edilen pigmentlerin hemolitik aktivitelerinin belirlenmesi

Yapılan çalışmada izole edilen pigmentlerin eritrosit hücrelerine olan etkisini araştırmak için ana stok konsantrasyonları tüm pigmentler için 7,32 olarak ayarlanmış ve 10^{-2} oranına kadar dilüe edilerek 3 farklı konsantrasyonda (7,32, 0,732, ve 0,0732 mg/ml) hücelere uygulanmıştır. Pozitif kontrole göre yapılan değerlendirme sonucunda pigmentlerin bu yüksek dozlarda bile kanda hemoliz meydana getirmediği belirlenmiştir. Literatürde bu izolatlar ve bunlardan izole edilen pigmentlerin memeli eritrosit hücreleri üzerine olan etkisine bakılmadığı gözlemlenmiş olup böyle bir çalışma da bu yöntem ilk kez değerlendirilmiştir.

4.5.2.3. Hücre Canlılığı Üzerine Etkilerinin Tespiti

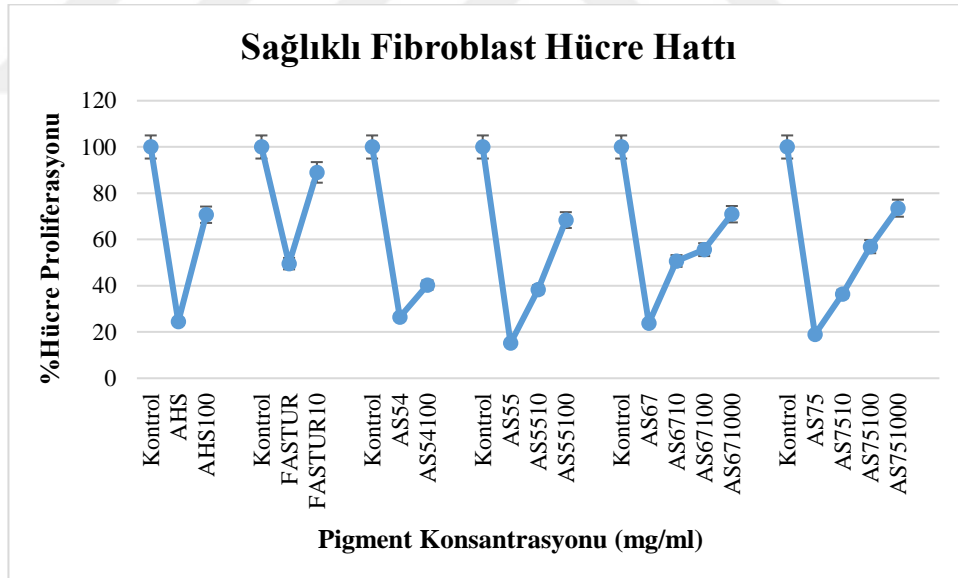
Çalışmada kullanılan sağlıklı fibroblast hücre hattı üzerinde izole edilen pigmentlerin etkisini tespit etmek amacıyla MTT boyası uygulanmıştır. İzole edilen pigmentler gram cinsinden hesaplanarak PBS içerisinde çözülmüş ve hücre kültüründe kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir (Şekil 4.12). Pigmentlerin elde edilmesi sırasında çözücü olarak kullanılan %95'lik metanolün saflık değeri hücreler için toksik olduğundan tamamen uçurulmuş ve pigmentler onun yerine PBS ile çözdürülerek sağlıklı fibroblast hücrelerine verilmiştir. Tüm izole edilen pigmentler ana stoklar 37,2 mg olacak şekilde ayarlanmıştır. 37,2, 3,72, 0,372 ve 0,0372 mg'lik konsantrasyonlarda 10^{-4} 'e kadar seyreltilen pigmentler hücelere verilmiş ve MTT sonuçları değerlendirilmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12 İzole edilen pigmentlerin PBS içerisinde çözünmesi

MTT test sonuçlarına göre; hücrelerin 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücelere verilen AHS pigmenti için; 37,2 mg'lık konsantrasyonda %24,43 oranında, 0,372 mg'lık konsantrasyonda ise %70 oranında kontrole göre hücre canlılığının

olduğu, FAS-TUR pigmenti için 37,2 mg'lık konsantrasyonda %49,5, 3,72 mg'lık konsantrasyonda %89 oranında kontrole göre hücre canlılığının olduğu, AS-54 pigmenti için; 37,2 mg'lık konsantrasyonda %26,42 oranında, 0,372 mg'lık konsantrasyonda hücreye verildiğinde %40,29 oranında kontrole göre hücre canlılığının olduğu AS-55 pigmenti için; 37,2, 3,72 ve 0,372 mg'lık konsantrasyonlarda hücreye verildiğinde kontrole göre canlılığın sırasıyla %15, %38 ve %68,40 olduğu, AS-67 pigmenti için; 37,2, 3,72, 0,372 ve 0,0372 mg'lık konsantrasyonlarda hücreye verildiğinde kontrole göre canlılığın sırasıyla %23, %50, %55, %70 olduğu, AS-75 pigmenti için; 37,2, 3,72, 0,372 ve 0,0372 mg'lık konsantrasyonlarda hücreye verildiğinde ise kontrole göre canlılık oranlarının sırasıyla %18, %36, %56, %73 olduğu tespit edilmiştir. Yapılan literatür taramaları sonucunda izole edilen bakteriyel pigmentlerin etkisi genellikle kanser hücreleri üzerine çalışılmış olup sağlıklı fibroblast hücrelerinde sitotoksik etkisi ile ilgili çalışmaya tarafımızca rastlanmamıştır. Ancak yapılan bu çalışma sonucunda pigmentlerin hücrelere karşı sitotoksik etkisinin olmadığı ve bu nedenle canlı sağlığını tehdit etmeyen doğal boya olarak kullanımının mümkün olabileceği görülmüştür.



Şekil 4.13 İzole edilen pigmentlerin sitotoksik aktivitesi

4.6. İzole Edilen Pigmentlerin Kumaş Boyası Olarak Uygulanması

İzole edilen bakteriyel pigmentler ipek kumaş üzerine uygulanmış ve boyar özellikte olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 İpek kumaş boyama sonuçları

Tekstil endüstrisi dünya genelinde hızla büyüyen endüstrilerden biridir ve bu endüstride çok büyük miktarlarda sentetik boya kullanımı vardır. Boyama işlemleri ve bunlarının atıklarının ortadan kaldırılması sürecinde ortaya bir çok problem çıkmaktadır. Bu ciddi problemler nedeniyle doğal renklendiriciler boya endüstrisi için güvenli bir alternatif olabilir. Krishna *et al.* (2008), *Serratia sp.*'den izole edilen prodigiosin benzeri pigmentleri kumaş boyası olarak çeşitli tekstil malzemelerine uygulamış ve akabinde yaptığı yıkama uygulamaları sonucunda renklerin stabil kaldığını gözlemlemiştir. Ahmad *et al.* (2012), *S. marcescens* bakteri izolatından kırmızı prodigiosin, *C. violaceum* bakteri izolatından ise mor pigment izole ederek yün naylon ve ipek kumaşları üzerine boyama etkilerini incelemişler ve çalışmalarının sonucunda prodigiosin ve violacein için en yoğun boyamanın saf ipek ve ipek sateninde olduğunu bildirmişlerdir. Literatürdeki çalışmalar ve bizim çalışmamız özellikle prodigiosin pigmentinin tekstil boyası olarak kullanılması fikrini destekler yönde olmuştur.

Beta-karoten pigmentinin doğal boya olarak kullanımına yönelik literatürde çok çalışma olmadığı gözlenmiştir. Çalışmamızda ise bu pigmentin boyar özelliğinin olduğu tespit edilmiş olup yapılan boyama sonuçlarında iyileştirmeye gidilebileceği düşünülmüştür.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

İnsanlık tarihinin başlangıcından beri insanoğlunun farklı amaçlar için çeşitli boyama yöntemleriyle hayatının her alanına renk kattığı bilinmektedir. İnsanoğlunun en temel ihtiyaçları diğer tüm canlılar gibi beslenme, barınma ve korunmadır. Ancak insanoğlu sahip olduğu eşsiz düşünce sistemiyle diğer tüm canlılardan ayrılır. Bu nedenle yaşama kendinden bir iz bırakma, yaşadığı alana estetik yönden şekil verme dürtüsü en az hayatta kalma dürtüsü kadar güçlü bir dürtüdür. Renklendirme işlemi kimyasal boyaların sentezine kadar bitkiler, bazı hayvanlar ve madenler gibi doğadan elde edilen maddelerle gerçekleştirilmiştir. Ancak nüfusun ve dolayısıyla boya kullanımının artması doğal boyaların bu ihtiyaca cevap verememesine neden olmuştur. 1800’lü yıllarda sentetik boyaların keşfi, kullanımının yaygınlaşması ve sanayi devrimiyle birlikte tekstil endüstrisinde yaşanan ilerleme bu boyaların farklı ürünlerle dünyanın her bölgesine yayılması çevre ve insan sağlığı üzerinde geri dönüşümsüz birçok hasarın meydana gelmesine neden olmuştur. Geline nokta da görünen odur ki sentetik boya kullanımının bir an önce en aza indirilmesi, yeniden doğal kaynaklardan boya üretilmesi acil bir ihtiyaçtır. Ancak ilk insanların doğal boya kaynaklarına bakıldığında bu kaynakları bitkilerin ve böcek, salyangoz gibi bazı hayvanların oluşturması çevre ve insan sağlığı açısından diğer bir çelişkidir. Doğal boya üretiminde kullanılan bitkiler incelendiğinde çoğunun besin, baharat ve gıda gibi birçok amaçla tüketilen tıbbi ve aromatik bitkiler olduğu görülür. Günümüzde birçok Avrupa Birliği kuruluşu, kalkınma ajansları, Tarım ve Gıda Bakanlığı doğal boya üretimi için kullanılan birçok bitkinin tarımını hibe kredilerle desteklemektedir. Hayvansal kaynakların doğal boya üretimi için kullanımı ise etik sebepler nedeniyle mümkün olmamaktadır. Bitkisel boyama yapılırken elde edilen renk tonu, bitkinin sahip olduğu boyar madde miktarına bağlıdır. Bitkinin sahip olduğu boyar madde miktarını ise etkileyen birçok etken mevcuttur. Bu etkenlerden bazıları bitkilerin toplanma zamanları, hangi bölgede yetiştiği, bitkinin yetiştiği toprağın içeriği, kullanılan gübreler, bitkinin yetiştiği dönemde maruz kaldığı yağış, ışık, rüzgâr gibi iklimsel faktörler, bitkinin kurutulma yöntemidir. Günümüz modern dünyası düşünüldüğünde bir tekstil ürününün standart renge sahip olması pazarlanabilmesi ve ticari öneme sahip olabilmesi için büyük önem arz etmektedir. Ayrıca dünyada yaşanan açlık ve ilaç hammaddesi sıkıntısı,

bitkilerin sadece estetik ve ticari kaygılarla kullanımının ne kadar etik konusunda akılda bazı sorular ortaya çıkarmaktadır.

Mikrobiyal kaynakların herhangi bir etik kaygı olmadan arzu edildiği miktarda üretilmesi, her türlü ham madde eldesi için üretim işlemlerinde standardizasyonun yapılabilmesi doğal boyar madde kaynağı için mikroorganizmaları bir cazibe merkezi haline getirmiştir. Bu nedenle 'Pigment üreten bakterilerin izolasyonu, tanılanması ve tekstil endüstrisinde boyar madde olarak kullanılması' başlıklı tez boya eldesinde bakterileri kaynak olarak kullandığı için büyük önem arz etmektedir. Dünya literatürünü taradığımızda mikrobiyal kaynaklardan boyar madde eldesi ile ilgili birçok araştırma mevcutken ülkemiz literatürü için bu tez ilk araştırma çalışmasıdır. Bu tezde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda; pigment oluşumu tespit edilen 6 bakteri izolatu *M. luteus*, *P. marcusii*, *S. plymuthica* ve *S. marcescens* olarak tanılanmıştır.

Bakteriyel izolatlardan elde edilen pigmentlerin antimikrobiyal özellikleri, hemolitik aktiviteleri ile hücrelere toksisitesine bakılmıştır. Yapılan testler sonucunda uygulama yapılan patojen türlere karşı antimikrobiyal etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Hemolitik aktiviteleri değerlendirildiğinde pigmentlerin memeli eritrosit hücreleri üzerine olumsuz etkisinin olmadığı ve hücre kültürüne uygulamaları neticesinde de sitotoksik etkilerinin gözlenmediği tespit edilmiştir. Boyar özelliklerinin tespiti amacıyla yapılan çalışmada da tekstil endüstrisinde ipek boyama özelliklerinin olduğu gözlenmiştir. Yapılan boyamalar sadece boya, saf su ve küçük bir miktar tuz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tekstil ürünlerinin boyanmasında boyanın kumaşa tutunması ve sonrasında kumaşa uzun yıllar boyunca etkilenmeden kalması için farklı doğal ve sentetik maddelerin mordan olarak kullanıldığı bilinmektedir. Kullanılan mordan çeşidi, miktarı ve şekli elde edilen renk skalasını da etkilemektedir. Bu nedenle çalışmanın sonraki adımlarında elde edilen pigmentlerle farklı doğal (kül suyu, kireç taşı, maya ekstraktı, yosun, kil, sirke, vb.) ve sentetik (şap, potasyum bikromat, sodyum sülfat, alüminyum sülfat, bakır sülfat, çinko klor, vb) mordanlar kullanılarak yeni boyamalar yapılması ve bir renk skalası elde edilmesi amaçlanmaktadır. Tezin çalışmalarında boyanan materyal olarak sadece ipek kumaş kullanılmıştır. İpek kumaş sahip olduğu özellikler nedeniyle boyanması en kolay olan kumaşlardan biri olmasına rağmen üretim maliyeti çok yüksektir. Bu nedenle üretim maliyetinin düşük olması

nedeniyle pamuklu ve yünlü kumaşların boyanması ve bu kumaşların ne kadar etkin boyandığının gözlenmesi gerekmektedir.

Boyanmış yün, ipek ve pamuk materyalin rengin üretimi ve kullanımı esnasında ısıya, ışığa, sürtünmeye ve yıkanmaya karşı gösterdiği dirence ‘haslık’ adı verilir. Bunların içinde en önemlisi ışığa karşı olan dirençtir ve kumaşın ışıkla uğradığı değişikliğe ‘solma’ denir. Solma olayı kendini rengin açılması, koyulaşması, dalgalı görüntü oluşması veya tamamen yok olmasıyla gösterebilir. Renk değişimine yol açan diğer etkenler ise yıkanma, ıslak ve kuru sürtünme, su ve insan teridir. Bir boya güneş ışığı, su, alkali, yıkama, kuru temizleme, sürtünme, ütü gibi etkilere karşı koyabilse de, renk değiştirmiyorsa haslık derecesi yüksek kabul edilmektedir. Çalışmanın sonraki adımlarında pigmentlerin uygulandığı farklı kumaşların haslık derecelerinin belirlenmesi önerilmektedir.

Çalışmada pigment üretimi amacıyla bakteriler inkübe edilirken ticari besiyerleri kullanılmıştır. Ancak, ticari besiyeri kullanımı endüstriyel ölçekte pigment üretimi amaçlandığında ekonomik bir yaklaşım olmayacaktır. Bu nedenle kullanılan bakterilerin inkübe edilebileceği melas, peyniraltı suyu gibi daha ekonomik besiyerlerinin araştırılması uygun bir yaklaşım olacaktır. Ayrıca bakterilerin pigment üretimi tek bir koşulda sağlanmış olup farklı karbon kaynakları, farklı azot kaynakları, sıcaklık, asidite, süre gibi farklı parametrelerin pigment üretimi verimi üzerine etkisi araştırılmamıştır. Çalışmanın bir sonraki basamağında optimum pigment üretimi koşullarının belirlenmesi hedeflenmektedir.

Çalışma sırasında ekstrakte edilen pigmentlerin çeşidi UV-Spektrofometri ve TLC yöntemleriyle tahmin edilmiştir. Ancak pigmentlerin çeşidi hakkında kesin bir sonuca varmak için FTIR, ESI-MS, NMR, HPLC and jel filtrasyon kromatografisi yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir.

Pigment üretimi sürecinde kullanılan bakterilerin 5 gün gibi uzun bir süre inkübasyona bırakılması endüstriyel uygulamalar için pratik bir yaklaşım değildir. Aynı zamanda çok az bir miktarda pigment eldesi için bile büyük miktarlarda besiyerine ekim yapılması yine kullanılan yöntemin dezavantajlarından biridir. Bu nedenle ekstrakte

edilen pigmentlerin kesin tanısı yapıldıktan sonra, bu pigmentlerin üretiminden sorumlu gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılması ve rekombinant DNA teknolojisiyle güçlü promotorlara sahip ekspresyon vektörlerine klonlanması önerilmektedir. Bu sayede ortalama 4 saat gibi bir sürede, çok küçük bir besiyeri hacminde daha önce elde ettiğimiz pigmentin yüzlerce katı miktarında pigment elde edilmesi mümkün olacaktır.

Tez çalışması sırasında kullanılan pigmentlerin sadece antimikrobiyal özelliği araştırılmıştır. Fakat literatürde bu tür metabolitlerin antifungal, antioksidant, antikanser gibi başka özelliklerinin de bulunduğu dair kayıtlar mevcuttur. Bu nedenle ekstrakte edilen pigmentlerin antifungal, antioksidant, antikanser gibi özelliklerinin araştırılması, pigmentlerin kullanım alanı çerçevesini genişletebilmek adına önerilmektedir.

Yapılan toksisite testlerinden elde edilen olumlu sonuçlar elde edilen boyar maddelerin çevre dostu olduğu, çevre ve insan sağlığı üzerine olumsuz etkisinin olmayacağı kanaatini destekler niteliktedir. Ancak kullanılan testlere ilaveten yeni toksisite testlerinin yanısıra *in-vivo* deneylerinin yapılması bu kanaati kesin bir yargıya ulaştıracağından, *in-vivo* deneylerinin yapılması önerilmektedir. *In-vivo*'da özellikle fare deneylerinde pigmentlerin hem besin ek maddesi olarak kullanılması hem de deri üzerine uygulanması önerilmektedir. Deri üzerine pigment uygulamasında herhangi bir toksik etki görülmediği takdirde pigmentlerin ruj, allık gibi renkli kozmetik ürünleri üretiminde kullanım imkanının araştırılması önerilmektedir. Yine besin ek maddesi olarak kullanılan pigmentlerin herhangi bir toksik etki göstermemesi durumunda gıda boyası olarak kullanım imkânının araştırılması uygun görülmektedir. Hem sentetik renkli kozmetik ürünlerin hem de gıda boyalarının insan sağlığı üzerine son derece zararlı etkileri olduğu bilinmesine rağmen dünya pazarında sahip olduğu büyük pay gözönüne alındığında, kullanıma kazandırılan bu pigmentler ile elde edilmiş boyar maddelerin ülkemiz ekonomisine katkısının çok büyük olacağı aşikardır.

KAYNAKLAR

- Abdalla, D.S.P. 2003. Coronary heart disease antioxidant status. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition),1654-1663.
- Abraham, J. and Chauhan, R. 2018. Profiling of red pigment produced by *Streptomyces* sp. JAR6 and its bioactivity. *3 Biotech*, 8(1), 22.
- Adiguzel, A., Agar, G., Baris, O., Gulluce, M., Sahin, F. and Sengul, M., 2006. RAPD and FAME analyses of *Astragalus* species growing in eastern Anatolia region of Turkey. *Biochemical Systematics and Ecology* 34(5), 424-432.
- Ahmad, AS., Ahmad, WYW., Zakaria, ZK. 2012 Applications of bacterial pigments as colorant. The Malaysian perspective, Springer Briefs in Molecular Science, 77, New York, USA.
- Ako, H., Tamaru, C. S., Asano, L., Yuen, B. and Yamamoto, M., 2000. Achieving natural coloration in fish under culture. Spawning and maturation of aquatic species, UJNR Technical Report(28).
- Alihosseini, F., Ju, K. S., Lango, J., Hammock, B. D. and Sun, G., 2008. Antibacterial colorants: characterization of prodiginines and their applications on textile materials. *Biotechnology progress*, 24(3), 742-747.
- Astley, S. B. 2003. Antioxidants Role of Antioxidant Nutrients in Defense Systems. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), 282-289.
- Atlı, B. 2010. Gıda Boyaları. Yüksek Lisans, Namık Kemal Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 75, Tekirdağ.
- Babu, PVA and Liu, D. 2009. Flavonoids and cardiovascular health. Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population, Elsevier, 371-392.
- Baltacı, M.Ö. 2015. Erzurum Mezbahalarından Toplanan İşkembe Örneklerinden Selülitik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve Moleküler Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 89, Erzurum.
- Beets, G. D. 2006. Other spoilage bacteria, In: Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 668-693.
- Büyüksırt, T. ve Kuleaşan, H. 2013. Farklı Kaynaklardan Doğal Renk Maddesi Üreten Mikroorganizmaların İzolasyonu, Tanısı ve Elde Edilen Pigmentlerin Karakterizasyonu. *Gıda Dergisi*, 38,(4).
- Chandra, T. S., Lekha, V., Krishna, T. M. 2018. Effect Of Music On Growth And Pigment Production Of *Brevibacterium* sp. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*, 8(1).
- Chavan, R. 2013. Health and Environmental Hazards of Synthetic Dyes. Textile review magazine.
- Chen, K. and Roca, M. 2018. In vitro bioavailability of chlorophyll pigments from edible seaweeds. *Journal of Functional Foods*, 41, 25-33.
- Christinet, L., Burdet, F. X., Zaiko, M., Hinz, U., Zrýd, J. P. 2004. Characterization and functional identification of a novel plant 4, 5-extradiol dioxygenase involved in

- betalain pigment biosynthesis in *Portulaca grandiflora*. *Plant Physiology*, 134(1), 265-274.
- Çakmakçı, Ç. 1994. Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi Gıda Bilimi ve Teknolojisi Bölümü, Erzurum.
- Darwin, F. 1959. *The Life and Letters of Charles Darwin*. Basic Books, New York.
- Dölen, E. 1992. Tekstil tarihi: Dünyada ve Türkiye' de tekstil teknolojisinin ve sanayinin tarihsel gelişimi, Marmara Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi, İstanbul.
- Dufosse, L. 2009. Pigments, microbial. *Encyclopedia Microbiol*, (4), 457-71.
- Elkenawy, N. M., Yassin, A. S., Elhifnawy, H. N., Amin, M. A. 2017. Optimization of prodigiosin production by *Serratia marcescens* using crude glycerol and enhancing production using gamma radiation. *Biotechnology reports*, 14, 47-53.
- Erdal, P. ve Ökmen, G. 2013. Gıdalarda Kullanılan Mikrobiyal Kaynaklı Pigmentler. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, (2), 56-68.
- Farmer, J., Davis, B. R., Hickman-Brenner, F., McWhorter, A., Huntley-Carter, G., Asbury, M., Riddle, C., Wathen-Grady, H., Elias, C. and Fanning, G. 1985. Biochemical identification of new species and biogroups of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *Journal of clinical microbiology*, 21(1), 46-76.
- Farazuddin, M., Dua, B., Zia, Q., Khan, A. A., Joshi, B., Owais. M. (2014). Chemotherapeutic potential of curcumin-bearing microcells against hepatocellular carcinoma in model animals. *International Journal of Nanomedicine*, 9, 1139.
- Forgacs, E., Cserhati, T. and Oros, G. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment International*, 30(7), 953-971.
- Forkmann, G. 1991. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. *Plant breeding*, 106(1), 1-26.
- Gondil, V. S., Asif, M., Bhalla, T. C. 2017. Optimization of physicochemical parameters influencing the production of prodigiosin from *Serratia nematodiphila* RL2 and exploring its antibacterial activity. *3 Biotech*, 7(5), 338.
- Goswami, B., Bhowal, J. 2014. Identification and characterization of extracellular red pigment producing bacteria isolated from soil. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 3(9), 169-176.
- Görmez, A. 2011. Erzurum ilinde kayısı ağaçlarından izole edilen *Pseudomonas* türlerinin tanısı, karakterizasyonu ve çeşit reaksiyonları. Doktora Tezi, Atatürk Üniv, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bitki Koruma Anabilim Dalı, 183, Erzurum.
- Greenblatt, C. L., Baum, J., Klein, B. Y., Nachshon, S., Koltunov, V., Cano, R. J. 2004. *Micrococcus luteus*-survival in amber. *Microbial ecology*, 48(1), 120-127.
- Grimm, B., Porra, R. J., Rüdiger, W., Scheer, H. 2006. Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. *Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications Advances in Photosynthesis and Respiration*, 25, 1-26.
- Grimont, F., Grimont, P. A. 2006. The genus *serratia*. In *The prokaryotes*. Springer, 219-244, New York, NY.

- Gulrajani, M. L., Gupta, D. 1992. Natural dyes and Their Application to Textile. Department of Textile Technology, Indian Institute of Technology, 10-25.
- Gutiérrez-Barranquero, J. A., Parages, M. L., Dobson, A. D., Reen, F. J., O’Gara, F. 2019. Genome Sequence of *Paracoccus* sp. JM45, a Bacterial Strain Isolated from a Marine Sponge with a Dual Quorum Sensing Inhibition Activity. *Microbiol Resour Announc*, 8(2), e01496-18.
- Gülmüş, E. Ö., Görmez, A., 2018. Determination of Protease Enzyme Activity of *Bacillus pumilus* NK14 Isolate and Detection of the Stain Removal Effect of the Enzyme. *International Journal of Multidisciplinary Studies and Innovative Technologies*, 2(2), 7-12.
- Harker, M., Hirschberg, J., Oren, A. 1998. *Paracoccus marcusii* sp. nov., an orange gram-negative coccus. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 48(2), 543-548.
- Harley, J.P. and Prescott, L.M. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology 4th Edition. The McGraw-Hill Companies, New York.
- Hejazi, A., Falkiner, F. R. 1997. *Serratia marcescens*. *Journal of medical microbiology*, 46(11), 903-912.
- Horinouchi, S., Ueda, K., Nakayama, J. and Ikeda, T. 2010. Cell-to-cell communications among microorganisms. *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, Elsevier Ltd., 283-337
- Inborr, J. 1998. Haematococcus, the poultry pigmentor. *Feed mix*, 6-31.
- Indra Arulselvi, P., Umamaheswari, S., Ranandkumar Sharma, G., Karthik, C., Jayakrishna, C. 2014. Screening of yellow pigment producing bacterial isolates from various eco-climatic areas and analysis of the carotenoid produced by the isolate. *J Food Process Technol*, 5(292), 2.
- Khanafari, A., Assadi, M. M. and Fakhri F. A. 2006. Review of prodigiosin, pigmentation in *Serratia marcescens*. *Online Journal of Biological Sciences*, 6(1), 1-13.
- Klement, Z., Rudolph, K. and Sands, D.C. 1990. *Methods in Phytopathology*. Akademiai Kiado, 153-180, Budapest.
- Kodach, L. L., Bos, C. L., Durán, N., Peppelenbosch, M. P., Ferreira, C. V. and Hardwick, J. C. 2005. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*, 27(3), 508-516.
- Kumar, J. K. and Sinha, A. K. 2004. Resurgence of natural colourants: A holistic view. *Natural Product Research*, 18(1), 59-84.
- Laatsch, H., Thomson, R. H. and Cox, P. J. 1984. Spectroscopic properties of violacein and related compounds: crystal structure of tetramethylviolacein. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2(8), 1331-1339.
- Lea, A. and Henry, B. 2003. Colorants (Colourants) Properties and Determination of Natural Pigments, In: *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (Second Edition). Academic Press, Benjamin Caballero, 1550-1556, ABD.
- Lelliott, R. A. and Stead, D. E. 1987. *Methods for The Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Blacwell Scientific Publications, 216.

- Leon, E., Rosenberg, D. D. 2012. Single-Gene Defects. *Human Genes and Genomes*, 169-196.
- Leon, L., Miranda, C., De Souza, A. and Durán, N. 2001. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(3), 449-450.
- Masuelli, L., Pantanella, F., La Regina, G., Benvenuto, M., Fantini, M., Mattera, R., Di Stefano, E., Mattei, M., Silvestri, R. and Schippa, S. 2016. Violacein, an indole-derived purple-colored natural pigment produced by *Janthinobacterium lividum*, inhibits the growth of head and neck carcinoma cell lines both in vitro and in vivo. *Tumor Biology*, 37(3), 3705-3717.
- Mavrodi, D. V., Peever, T. L., Mavrodi, O. V., Parejko, J. A., Raaijmakers, J. M., Lemanceau, P., Mazurier, S., Heide, L., Blankenfeldt, W. and Weller, D. M. 2010. Diversity and evolution of the phenazine biosynthesis pathway. *Applied and environmental microbiology*, 76(3), 866-879.
- Mavrodi, D. V., Blankenfeldt, W. and Thomashow, L. S. 2006. Phenazine compounds in fluorescent *Pseudomonas spp.* biosynthesis and regulation. *Annu. Rev. Phytopathol*, 44, 417-445.
- Meenakshi, N. R., Chauhan, A. 2018. Extraction and characterization of biocolors from bacterial isolates of *Pseudomonas sp.* M1 and MS2. *Ann. Phytomed*, 7(1), 63-68.
- Meerlo, V. J., Kaspers, G. J. and Cloos, J. 2011. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In *Cancer cell culture*. Humana Press, 237-245, UK.
- Mentel, M., Ahuja, E. G., Mavrodi, D. V., Breinbauer, R., Thomashow, L. S. and Blankenfeldt, W. 2009. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem*, 10(14), 2295-2304.
- Mills, S. Y. and Bone, K. 2013. *Principles and Practice of Phytotherapy, Modern Herbal Medicine, 2: Principles and Practice of Phytotherapy*. Elsevier Health Sciences.
- Nakamura, Y., Asada, C. and Sawada, T. 2003. Production of antibacterial violet pigment by psychrotropic bacterium RT102 strain. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(1), 37-40.
- Numan, M., Bashir, S., Mumtaz, R., Tayyab, S., Ullah, I., Khan, A. L., Al-Harrasi, A. 2018. Chemical profile and in-vitro pharmacological activities of yellow pigment extracted from *Arthrobacter gandavensis*. *Process biochemistry*, 75, 74-82.
- Özcan, M. ve Akgül, A. 1995. Gıdalar İçin Doğal Renk Maddeleri-I. *Gıda Dergisi*, 20(4).
- Özkan, H. 2009. Erzurum Çevresinde Biyolojik Bozulmaya Neden Olan Heterotrofik Bakterilerin İzolasyonu, Karakterizasyonu ve Tanısı. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 89, Erzurum.
- Rahul, S., Chandrashekar, P., Hemant, B., Bipinchandra, S., Mouray, E., Grellier, P. and Satish P. 2015. In vitro antiparasitic activity of microbial pigments and their combination with phytosynthesized metal nanoparticles. *Parasitology international*, 64(5), 353-356.

- Rodrigues, A. L., Göcke, Y., Bolten, C., Brock, N. L., Dickschat, J. S. and Wittmann, C. 2012. Microbial production of the drugs violacein and deoxyviolacein: analytical development and strain comparison. *Biotechnology letters*, 34(4), 717-720.
- Saikhao, L., Setthayanond, J., Karpkird, T., Bechtold, T. and Suwanruji, P. 2018. Green reducing agents for indigo dyeing on cotton fabrics. *Journal of Cleaner Production*, 197, 106-113.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Samyuktha, S. and Mahajan, S. N. 2016. Isolation and identification of pigment producing bacteria and characterization of extracted pigments. *IJAR*, 2(7), 657-664.
- Sarı, B. 2016. Rize Ayder Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu, Ksilanaz Enziminin *Geobacillus galactosidasius* BS61 Bakterisinden Saflaştırılması ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 87, Erzurum.
- Saygılı, H. 1995. Fitobakteriyoloji. Ege Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, 203, Bornova-İzmir.
- Shetti, A. A. 2017. Antibacterial Potentials of Red Pigment Extracted from Soil Isolate *Serratia sp.* IOSR-JBB, 3, 49-52.
- Siva, R. 2007. Status of natural dyes and dye-yielding plants in India. *Current Science*, 92(7), 916-925.
- Srikanlayanukul, M., Khanongnuch, C. and Lumyong, S. 2006. Decolorization of textile wastewater by immobilized *Coriolus versicolor* RC3 in repeated-batch system with the effect of sugar addition. *CMU J*, 5(3), 301.
- Srimathi, P. R., Nirmala, M., Malarvizhi, A. 2017. Isolation, Identification, Optimization of Prodigiosin Pigment Produced by *Serratia marcescens* and its Applications. *International Journal of Latest Engineering and Management Research*, 2(9), 11-21.
- Stead D. E., Hennessy, J., and Wilson, J. 1998. Modern methods for identifying bacteria. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 52(1-2), 17-25.
- Stintzing, F. C., Carle, R. 2004. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in food science & technology*, 15(1), 19-38.
- Sudova, E., Machova, J., Svobodova, Z. and Vesely, T. 2007. Negative effects of malachite green and possibilities of its replacement in the treatment of fish eggs and fish: a review. *Veterinari Medicina*, 52(12), 527-539.
- Sumathi, C., MohanaPriya, D., Swarnalatha, S., Dinesh, M. G., Sekaran, G. 2014. Production of prodigiosin using tannery fleshing and evaluating its pharmacological effects. *The Scientific World Journal*, 8.
- Suryawanshi, T., Nair, V., Patel P. Durve-Gupta, A. 2018. Isolation of pigmented bacteria for various applications. *Indian Journal Of Applied Research*, 7(1), 20-23.

- Tandale, A., Khandagale, M., Palaskar, R., Kulkarni, S. 2018. Lip Balm Production from Pigment Producing *Actinomyces*, 5, 555-562.
- Tarakçioğlu, S. 2016. Erzurum İlica Kaplıcalarından Alınan Su Örneklerinden Termofilik Bakterilerin İzolasyonu, İdentifikasyonu ve *Bacillus thermoamylovorans* ST10 İzolatından Lipaz Enziminin Saflaştırılması, Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, 106, Erzurum.
- Trivedi, N., Tandon, S., Dubey, A. 2017. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) profiling of red pigment produced by *Bacillus subtilis* PD5. *African Journal of Biotechnology*, 16(27), 1507-1512.
- Tsuyoshi, N., Fudou, R., Yamanaka, S., Furunaga, T., Sato, K. and Kondo, Y. 2004. Decoloring ink for ink jet printing and ink jet printing method using it, Google Patents, 10/475,882.
- Venil, C. K., Zakaria, Z. A. and Ahmad, W. A. 2013. Bacterial pigments and their applications. *Process Biochemistry*, 48(7), 1065-1079.
- Vidyalakshmi, R., Paranthaman, R., Muruges, S. and Singaravadivel, K. 2009. Microbial bioconversion of rice broken to food grade pigments. *Glob J Biotechnol Biochem*, 4(2), 84-87.
- Wiegand, I., Hilpert, K. and Hancock, R. E. W. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.
- Wu, X., Deutschbauer, A. M., Kazakov, A. E., Wetmore, K. M., Cwick, B. A., Walker, R. M., Novichkov, P. S., Arkin, A. P. and Chakraborty, R. 2017. Draft genome sequences of two *Janthinobacterium lividum* strains, isolated from pristine groundwater collected from the Oak Ridge Field Research Center. *Genome announcements*, 5(26), e00582-00517.
- Yada, S., Wang, Y., Zou Y., Nagasaki, K., Hosokawa, K., Osaka, I., Arakawa, R. and Enomoto, K. 2008. Isolation and characterization of two groups of novel marine bacteria producing violacein. *Marine biotechnology*, 10(2), 128-132.
- Yolmeh, M., Najafi, M. B. H., Farhoosh, R. 2014. Optimisation of ultrasound-assisted extraction of natural pigment from annatto seeds by response surface methodology (RSM). *Food Chemistry*, 155, 319-324.
- Yu, T., Malugin, A. and Ghandehari, H. 2011. Impact of Silica Nanoparticle Design on Cellular Toxicity and Hemolytic Activity. *Acs Nano*, 5(7), 5717-5728.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı-Soyadı : Merve ŞİMŞEK
Uyruğu : TC
Doğum Tarihi ve Yeri : 01.01.1995
Medeni Hali : Bekar
Telefon : +90545 327 04 09
e-mail : merve.simsek49@erzurum.edu.tr

Eğitim

Derece	Üniversite	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2019
Lisans	Erzurum Teknik Üniversitesi	2016
Lise	Erzurum Lisesi	2012

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Arılab Firması / 2016-2017

Uluslararası Kongre Sunum :

1. **Simsek M.**, Gormez A., Efe D. 2018. Isolation and Identification of Pigment Producing Bacteria and Evaluation of Their Usage Potentials as Biocolorants in Biotechnology, International Symposium On Applied Sciences And Engeneering (ISASE 2018), 25-28 November, Ataturk University, ISASE 2018 Conference Proceedings Book of Full Text, 103, Erzurum.